



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Tesi di dottorato

**Studio prospettico sull'efficacia e la tollerabilità di un
integratore alimentare nei pazienti affetti da infertilità
primaria con astenoteratozoospermia idiopatica.**

Relatore:

Chiar.mo Prof.

Vincenzo Gentile

Dottorando:

Gian Maria Busetto

Matr. 937709

Anno Accademico 2016/2017

INDICE

pag.

1) Introduzione	3
2) L'esame del liquido seminale	10
3) Il varicocele	17
4) Razionale dello studio	28
5) Scopo e obiettivi	32
6) Materiali e metodi	33
7) Analisi statistica	45
8) Consenso informato e valutazioni etiche	47
9) Risultati	48
10) Discussione	53

INTRODUZIONE

Nei paesi industrializzati l'infertilità è un problema che interessa circa il 15-20% delle coppie. Possiamo valutare in circa 30-40% la responsabilità dipendente dal fattore maschile, cui si può aggiungere un 20% in cui vi sia una responsabilità in entrambi i partner. Analoghe considerazioni si possono fare per l'incidenza della componente femminile. Rimane un 10-20% di casi in cui l'infertilità è idiopatica. Esistono però dubbi sia per quanto riguarda una stima esatta dell'incidenza della componente maschile (probabilmente sottostimata) sia per quanto riguarda una esatta classificazione etiologica dell'infertilità maschile stessa. In particolare nonostante l'evolversi delle metodiche di indagine seminologica, non esiste a tutt'oggi un esame in grado di attestare la potenziale fertilità di un liquido seminale. Un confine che separi la condizione di infertilità da quella di fertilità è ancora da dimostrare.

L'uso delle varie tecniche di micromanipolazione associate a IVF possono consentire gravidanze anche in presenza di liquidi seminali con gravissime oligozoospermie, o, addirittura, azoospermici. Questi dati, relativamente confortanti, spesso esasperano una tendenza, già storicamente spiccata, a trascurare o ritardare un adeguato intervento diagnostico e terapeutico dell'andrologo o, addirittura, a non effettuarlo del tutto.

L'importanza di una precoce e accurata valutazione maschile, nello studio di una coppia infertile, è determinante perché spesso tali problematiche possono essere individuate e trattate in modo mirato e, anche qualora permanga una incapacità di fecondare per via naturale, il maschio potrà esprimere il suo massimo potenziale di fertilità, prima di impegnare la coppia in metodiche ART con impegno fisico, psicologico e, non ultimo, economico.

In Italia, ogni anno, circa 48.000 nuove coppie scoprono di avere difficoltà a concepire e oltre 20.000 ricorrono ad una terapia per sterilità; di queste circa 10.000 si sottopongono a trattamenti di fecondazione assistita.

CAUSE DI INFERTILITA' MASCHILE

Cause genetiche: rappresentano una percentuale inferiore al 6%. Benché la patologia disgenetica interferisca a vari livelli con lo sviluppo ed il funzionamento dell'apparato genitale maschile, l'aspetto più noto e studiato riguarda la patologia cromosomica ed in particolare la sindrome di Klinefelter, che ha elevata incidenza (1 ogni 5-700 maschi nati vivi) ed è costantemente associata a sterilità. Il genotipo è caratterizzato dalla presenza di un cromosoma X sovrannumerario (47XXY) ed il fenotipo si manifesta con un ipogonadismo, scleroialinosi dei tubuli seminiferi ed azoospermia. Numerose altre patologie di origine genetiche, pur con un'incidenza molto rara, possono essere la causa di infertilità maschile.

Cause neuroendocrine: rappresentano l'8-10% delle cause di infertilità maschile. Le alterazioni ipotalamo-ipofisarie, che risultano in un deficit di gonadotropine (LH e FSH), causano una riduzione della steroidogenesi e della spermatogenesi. Questa condizione si può verificare per deficit isolato di gonadotropine (ipogonadismo ipogonadotropo, congenito o acquisito) o per panipopituitarismo.

L'ipogonadismo ipogonadotropo, è caratterizzato dalla incapacità di produrre le gonadotropine, o per mancanza dell'ormone ipotalamico GnRH o per una insufficienza ipofisaria. Se congenita questa disendocrinia determina una mancata accensione della pubertà con scarso o assente sviluppo dei caratteri sessuali secondari, assenza di spermatogenesi e ridotti livelli di gonadotropine e testosterone. Talvolta coesistono criptorchidismo o malformazioni peniene. L'accrescimento è normale ma l'età ossea è ritardata e un trattamento sostitutivo pulsatile con GnRH o con gonadotropine sarà in grado di determinare lo sviluppo genitale, la spermatogenesi e normali caratteri sessuali secondari.

L'ipogonadismo ipogonadotropo acquisito è una sindrome da ipogonadismo secondario che si instaura in epoca postpuberale. Si avrà dunque, in un soggetto con normali caratteri sessuali primari e secondari, una riduzione della libido, con impotenza sessuale e calo progressivo, fino alla azoospermia, della

spermatogenesi. Sarà presente, inoltre, una progressiva riduzione degli ormoni androgeni, diradamento pilizio, ridisposizione del grasso, possibile comparsa di ginecomastia.

Altre sindromi complesse si possono manifestare con l'ipogonadismo secondario: la sindrome di Prader-Willi, caratterizzata da ipogonadismo, ipotonia muscolare, ritardo staturo-ponderale, obesità e diabete; la sindrome di Rud, che associa l'ipogonadismo con l'ittiosi, con anomalie scheletriche e con gravi disturbi neurologici (oligofrenia ed epilessia); la sindrome di Laurence-Moon-Biedl, in cui coesistono ipogonadismo e retinite pigmentosa, obesità e polidattilia.

Esistono deficit isolati di produzione di FSH e di LH (in questo caso si parla di sindrome dell'eunuco fertile) ma queste sono di riscontro più raro. Si verificano, inoltre, quadri intermedi, in cui si possono riscontrare normali livelli di gonadotropine plasmatiche, ma uno studio della pulsatilità dell'LH, indice indiretto del ritmo di secrezione del GnRH, evidenzia una ridotta pulsatilità, per frequenza o per ampiezza, del pulsar ipotalamico.

Anche la sindrome di Cushing può essere causa di ridotta funzionalità ipotalamo-ipofisaria in quanto elevati livelli di cortisolo possono inibire la secrezione di LH.

L'iperprolattinemia può determinare un'alterazione della regolarità secretiva ipotalamo-ipofisaria con meccanismi diretti e indiretti.

Cause testicolari: il 12-16% delle infertilità maschili è dovuto ad un ipogonadismo primitivo (ipogonadismo ipergonadotropo). Possiamo distinguere tre situazioni: gli ipogonadismi a interessamento completo, a interessamento interstiziale e a interessamento tubulare. Nel primo gruppo annoveriamo l'anorchia bilaterale congenita, in cui soggetti a cariotipo e fenotipo maschile non presentano testicoli e talvolta hanno genitali esterni ambigui. Il fenotipo maschile e l'assenza dei dotti mülleriani depongono per la presenza dei testicoli durante il periodo critico della differenziazione sessuale nei primi mesi di vita intrauterina.

Gli ipogonadismi a interessamento interstiziale sono la aplasia delle cellule di Leydig, dovuta a un disordine congenito su base disembrionogenetica, che si manifesta con un quadro di pseudoermafroditismo maschile o con ambiguità

genitali, e i difetti enzimatici della steroidogenesi testicolare, anch'essi causa di pseudoermafroditismo maschile.

Tra le forme a interessamento tubulare, la sindrome a sole cellule di Sertoli (o sindrome di Del Castillo) si presenta in soggetti con normali caratteri sessuali maschili, testicoli talvolta piccoli e di consistenza aumentata, che presentano, come unico elemento patologico, una azoospermia dovuta ad aplasia congenita germinale.

Il criptorchidismo consiste nella mancata discesa del testicolo nella sua sede scrotale al momento della nascita. L'incidenza del criptorchidismo è del 3-4% dei neonati a termine ma diviene, già a un anno, dello 0.5-1%, sovrapponibile a quella dell'adulto. Si possono distinguere le distopie stabili (testicolo ritenuto o criptorchide) da quelle transitorie (testicolo retrattile). Negli ultimi venti anni sono stati effettuati numerosi studi per capire la reale importanza del criptorchidismo nella genesi di una futura infertilità. I concetti che attualmente sembrano prevalere sono i seguenti: la caratteristica fondamentale del criptorchidismo è una disgenesia di base, che condiziona tutte le involuzioni degenerative e morfologiche del testicolo. Tali alterazioni (infertilità, tumori) sono solo parzialmente reversibili con il posizionamento in sede scrotale, anche se effettuato nel periodo più idoneo, cioè tra il primo e il secondo anno di vita. Anche un testicolo mobile, retrattile, presenta una tendenza a manifestare una dispermia.

Le forme ad interessamento tubulare acquisite sono rappresentate da tutti quei quadri clinici in cui una causa esogena o endogena svolge un'azione lesiva su un testicolo fino ad allora sano. E' il caso delle orchiti infettive di origine virale, batterica o parassitaria (la più frequente è quella da virus della parotite), traumi, terapie antiblastiche, radiazioni termiche o ionizzanti, esiti di interventi chirurgici, etc. In tutti questi casi il quadro clinico sarà più grave se la noxa ha agito prima della pubertà e le manifestazioni saranno quasi sempre a carico della linea germinativa, essendo l'epitelio tubulare in assoluto il tessuto umano in più intensa attività riproduttiva e quindi il più vulnerabile di fronte a qualunque azione tossica, ipossica o comunque lesiva.

L'infertilità maschile può avere anche una patogenesi immunologica. Questa comprende una serie di disordini dovuti ad aggressione autoanticorpale contro antigeni specifici degli spermatozoi. Benché la presenza di anticorpi antispermatozoo sia dimostrabile in circa il 10% dei maschi infertili, è tutt'ora dubbio, nella genesi della difficoltà procreativa, il ruolo effettivo dei fattori autoimmuni, dai più considerati un fattore relativo e non assoluto di infertilità".

Cause urogenitali: la quota indubbiamente più elevata (60-70% delle infertilità maschili) è quella da cause urogenitali. Rientrano in questo gruppo tutte quelle noxe in grado di disturbare l'attività testicolare ed epididimaria e di impedire un normale transito degli spermatozoi lungo le vie seminali.

Il varicocele viene oggi considerato la causa più importante di infertilità maschile. L'esatta correlazione con la fertilità umana è ancora in parte non chiarita, soprattutto nei suoi meccanismi patogenetici, ma va sottolineato che questa patologia è presente nella popolazione maschile in percentuali variabili tra l'11 e il 22%, mentre tra i soggetti infertili è presente in percentuali variabili tra il 35 e il 45%.

Poiché il varicocele è in grado di determinare alterazioni della spermatogenesi indipendentemente dalla sua entità clinica, anche il varicocele subclinico è meritevole di considerazione diagnostica nel paziente infertile. La diminuzione della fertilità è progressiva e ingravescente nel tempo e si manifesta con alterazioni spermatozoarie di numero, motilità e morfologia. Inoltre, nel paziente infertile con varicocele, risultano spesso alterati sia i test di funzionalità spermatozoaria sia le concentrazioni di alcune sostanze biochimiche (zinco, oligoelementi, selenio, lipidi, etc.). Queste sostanze sono necessarie perché avvengano correttamente tutte le tappe che portano lo spermatozoo vicino all'ovocita, ne permettano il contatto, la reazione acrosomiale, la penetrazione attraverso la zona pellucida e lo spazio perivitellino e, infine la decondensazione della propria cromatina.

Le ostruzioni delle vie seminali, causa del 7-10% delle infertilità maschili, costituiscono una condizione di impedimento al transito e all'escrezione degli spermatozoi. Si possono verificare a vario livello (didimo-epididimario, intraepi-

didimario, epididimo-deferenziale, deferenziale, duttulare, etc.). Possono essere sia congenite, per agenesia o deconnessione di uno o più tratti delle vie seminali, mono o bilateralmente, che acquisite, in seguito a traumi, anche chirurgici, o come esito di infezione.

La patologia flogistico-infettiva del tratto genito-urinario, oltre ad essere la causa più frequente di interruzione della pervietà, rappresenta anche la condizione prognosticamente più negativa. In questi casi le ostruzioni possono essere mono o bilaterali, parziali o totali, e la prognosi è condizionata dall'estensione e dal consolidamento degli esiti flogistici.

Anche alcune alterazioni congenite o acquisite dell'uretra possono essere causa di infertilità. Le forme congenite sono, principalmente l'ipospadia, l'epispadia, la stenosi uretrale e l'uretra doppia. Le flogosi genito-urinarie, e in particolar modo le prostatovecicoliti croniche, determinano, da sole, il 15-25% delle infertilità maschili. Negli ultimi anni si è assistito a una modificazione dei quadri clinici da infezioni del tratto genito-urinario, grazie alle migliorate condizioni igieniche ed alla diffusione dei farmaci antimicrobici, cosicché, se da un lato sono ormai rare le orchiepididimiti da gonococco o da Gram negativi, spesso responsabili di atrofia testicolare, sono sempre più frequenti quadri clinicamente più sfumati, ma capaci di provocare infertilità, causati da germi diversi. Inoltre le flogosi prostatovecicolari determinano alterazioni delle caratteristiche fisico-chimiche della parte liquida dell'eiaculato (variazioni della viscosità e della fluidificazione, del pH, leucospermia, modificazioni dei livelli di zinco, acido citrico, fruttosio, etc.), determinando condizioni "ambientali" sfavorevoli per la funzionalità spermatica. Sempre più rilevante appare invece il ruolo della Chlamydia trachomatis e dell'Ureaplasma urealyticum nel sostenere flogosi genito-urinarie, fino a diventare i più frequenti responsabili di uretriti non gonococciche e di prostatovecicoliti croniche.

Oligozoospermie idiopatiche: sono quelle condizioni di oligozoospermia alla cui determinazione si arriva per esclusione, dopo che un'attenta valutazione, clinica, strumentale e laboratoristica e non si sia riusciti ad individuare una causa specifica. La frequenza con cui si giunge ad una tale conclusione diagnostica

presenta una variabilità enorme; si va, infatti, dal 10 fino a 70%. Vi sono, infatti, fattori (lo stress, la tossicità ambientale, l'importanza dell'abuso di alcolici o del fumo di sigarette, la sensibilità soggettiva alla tossicità dei farmaci o comunque la presenza di altri possibili fattori di disturbo della spermatogenesi) non sempre agevoli da quantificare e da dimostrare, ma che potrebbero giocare un ruolo significativo sia come elemento patogenetico nelle forme idiopatiche sia come concausa nelle forme in cui viene comunque individuato un fattore causale.

L'ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE

L'esame del liquido seminale rappresenta la prima ed irrinunciabile indagine diagnostica nello studio dell'infertilità maschile.

Per l'estrema semplicità di esecuzione, l'esame standard del liquido seminale deve essere il primo accertamento proposto non appena si pone il sospetto di infertilità, prima ancora che la partner venga sottoposta a lunghi e complessi accertamenti diagnostici.

L'attendibilità dell'esame dipende dall'esperienza e dalla capacità del seminologo, che deve esprimere un giudizio soggettivo su parametri fondamentali come la motilità e la morfologia. Inoltre anche i laboratori specializzati utilizzano differenti criteri di valutazione seminologica, con estrema difficoltà di confronto fra esami eseguiti in centri diversi.

Per tentare di risolvere questi problemi e per standardizzare la metodologia di laboratorio, a partire dal 1980 un comitato sotto l'egida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO), ha elaborato delle linee guida in cui sono riportate indicazioni per la corretta raccolta ed esecuzione dell'esame seminale; l'ultima edizione è del 2010.

Negli ultimi 15 anni si sono affiancati all'esame standard del liquido seminale numerosi altri accertamenti elaborati allo scopo di fornire informazioni più approfondite sulle reali capacità fecondanti dello spermatozoo.

Contemporaneamente, si sono compiuti enormi passi avanti nello studio morfologico dello spermatozoo con l'utilizzo della microscopia elettronica a scansione e a trasmissione.

Infine sono stati messi a punto numerosi test funzionali in grado di valutare con estrema precisione l'integrità di alcuni "compartimenti funzionali" dello spermatozoo quali la membrana, l'acrosoma, il DNA e le proteine nucleari.

Tutte queste indagini, senza dubbio più complesse e costose, vengono comunque considerate accertamenti di secondo livello da utilizzare solo in casi selezionati dopo l'esecuzione dell'esame seminale standard.

RACCOLTA E CONSEGNA DEL LIQUIDO SEMINALE

La raccolta per masturbazione rappresenta il solo metodo universalmente accettato. La tecnica di raccolta utilizzando il preservativo, durante il coito, è preferita da alcuni pazienti, ma quasi tutti i preservativi contengono sostanze spermiosotossiche.

Non sono accettabili altre tecniche di raccolta come il coito interrotto (possibile perdita di frazioni dell'eiaculato) o il prelevamento del seme in vagina dopo il rapporto (alterazione del pH e contaminazione batterica).

Il campione seminale deve essere raccolto interamente in un contenitore sterile di vetro o di plastica inerte (per esempio contenitori per urinocoltura). Raccolte incomplete con perdita di qualche frazione dell'eiaculato sono inattendibili e non devono venire esaminate.

Per ovvi motivi di tranquillità e riservatezza, il seme andrebbe raccolto a casa e consegnato in laboratorio nel minor tempo possibile (massimo entro un'ora), avendo cura, durante il trasporto, di non esporre il contenitore a temperature inferiori ai 20°C (diminuzione della motilità) o superiori ai 37°C (aumento della crescita batterica, alterazioni biochimiche del seme).

Per una valutazione iniziale adeguata dovrebbero venir esaminati due campioni seminali a distanza di un mese uno dall'altro. Se i risultati dei due esami sono nell'ambito della norma non è necessario ripeterlo; in caso di risultato anormale o di una notevole discrepanza tra i due, l'esame va ripetuto in quanto, in molti soggetti, si riscontra una notevole variabilità di alcuni parametri seminali come il volume, il numero e, in misura minore, la motilità.

ESAME MACROSCOPICO

Liquefazione

Se il campione viene consegnato entro 15 minuti, è possibile osservare la presenza del coagulo che si forma per azione di un enzima di origine prostatica (avente struttura simile alla trombina) su una proteina coagulabile di origine

vescicolare (differente dal fibrinogeno). La liquefazione avviene nel giro di 15-30 minuti, ad opera di un enzima prostatico, la seminina.

L'assenza del coagulo indica una ostruzione dei dotti eiaculatori o l'agenesia congenita delle vescicole seminali. L'assenza della liquefazione o una liquefazione incompleta è dovuta ad una mancanza o ad una ridotta funzione degli enzimi litici prostatici, come si verifica, per esempio, nella prostatite cronica.

Aspetto

Un campione normale ha di solito un aspetto omogeneo grigio-opalescente; può apparire decisamente meno opaco, quasi trasparente, in caso di assenza o netta riduzione del numero di spermatozoi; giallastro in caso di un prolungato periodo di astinenza o in presenza di infezioni; rosso brunastro quando è presente un elevato numero di globuli rossi.

Volume

Nel normale è compreso tra 1,5 e i 10 ml. Può variare fisiologicamente nello stesso individuo, anche di alcuni ml, in considerazione del tempo di astinenza e dell'entità dell'eccitazione.

In caso di riscontro di basso volume seminale è necessario avere informazioni su eventuali problemi di raccolta (perdite di frazioni dell'eiaculato, raccolta avvenuta senza la necessaria concentrazione in locali non idonei). In presenza di azoospermia e volume ripetutamente < ad 1 ml si sospetta una agenesia delle vescicole seminali.

Viscosità

In casi normali la lunghezza del filamento è compresa tra 1 e 2 cm. Una viscosità diminuita, simile a quella dell'acqua, è di comune riscontro nei pazienti azoospermici o gravemente oligospermici. Una viscosità aumentata o nettamente aumentata è presente in pazienti con infezioni seminali, ma può essere una

caratteristica individuale del seme anche in pazienti che non hanno mai avuto processi infettivi.

pH

Il range di normalità è estremamente ristretto essendo compreso tra 7.2 e 8.

Valori inferiori a 7.2 fanno pensare ad una agenesia delle vescicole seminali (che secernono abbondante secreto alcalino); valori superiori a 8 ad una infezione seminale o ad una insufficienza delle secrezioni prostatiche acide.

ESAME MICROSCOPICO

Il seme, non essendo un liquido omogeneo, deve essere ben miscelato prima di procedere all'esecuzione dell'esame microscopico, per evitare grossolani errori di valutazione, specie a carico del numero degli spermatozoi. Si pone poi su un vetrino portaoggetto un volume minimo di seme (non più di 20 microlitri), coperto da un coprioggetto di misura standard.

Per la valutazione di questi parametri si utilizza un microscopio a contrasto di fase con obiettivi 10, 25 e 40X.

Numero degli spermatozoi

Si osserva rapidamente a 10X, per valutare l'omogeneità del preparato. In caso affermativo è possibile contare il numero di spermatozoi con l'obiettivo 40X. Rispettando scrupolosamente queste condizioni standard, ogni spermatozoo osservato per campo microscopico corrisponde a circa 1.000.000/ml.

Questo discorso è valido specialmente per un numero di spermatozoi inferiore ai 30.000.000/ml, mentre per valori superiori il margine di errore potrebbe essere più ampio e dipende dall'esperienza dell'operatore.

Per un conteggio più preciso è comunque consigliata la lettura in camere contaglobuli (come per esempio la camera di Burkner) o in camera conta spermatozoi (camera di Makler); quest'ultima ha il pregio di evitare la diluizione preliminare in pipetta, permettendo un esame più rapido.

Il numero viene valutato per mL e per totale eiaculato.

Motilità

Si osserva di solito con obiettivo a 25X. Insieme alla valutazione morfologica, lo studio della cinetica nemaspermica rappresenta la parte più importante e cruciale della valutazione seminologica e richiede la presenza di un operatore attento ed esperto. Numerosi sono i criteri proposti per classificare la motilità dello spermatozoo.

Si valuta sia la percentuale di forme mobili che la qualità della motilità.

Si distinguono quattro tipi di motilità:

motilità progressiva;

motilità non progressiva;

immobilità.

Agglutinazioni

Durante la valutazione della motilità bisogna anche ricercare la eventuale presenza di agglutinazioni. Si distinguono delle agglutinazioni aspecifiche, di solito di medie o grandi dimensioni, formate da spermatozoi agglutinati intorno a cellule rotonde o a cellule di sfaldamento e delle agglutinazioni specifiche, solitamente di piccole o medie dimensioni, in cui gli spermatozoi, generalmente molto mobili, sono attaccati tra loro (testa-testa, testa-coda o coda-coda) e tentano inutilmente di distaccarsi.

Le agglutinazioni specifiche sono altamente suggestive per la presenza di anticorpi antispermatozoo, che devono essere assolutamente ricercati in questi casi.

Analisi morfologica

È il più importante dei singoli parametri ed il meno soggetto a variazioni nel tempo.

La constatazione che gli spermatozoi vengono sottoposti ad un processo di rigida selezione nel passaggio attraverso le vie genitali femminili e che solo alcuni di

essi morfologicamente perfetti sono in grado di arrivare fino all'oocita e di legarsi alla zona pellucida, ha determinato, in questi ultimi anni, una riconsiderazione critica del concetto di spermatozoo normale.

Secondo i criteri ristretti di normalità morfologica, lo spermatozoo è considerato normale solo se soddisfa le seguenti caratteristiche. Testa di forma ovale lunga da 5 a 6 micron, larga da 2.5 a 3.5 micron con un acrosoma ben delimitato occupante una superficie della testa compresa tra il 40% e il 70%. Non vi devono essere difetti a livello del collo del tratto intermedio e della coda o residui citoplasmatici più grandi di un terzo della testa dello spermatozoo. Utilizzando questi criteri è considerato fisiologico uno spermioγραμμα con almeno il 4% di forme normali.

LINEE GUIDA WHO 2010

Per ogni parametro seminale (numero, motilità e morfologia) nel Manuale OMS 2010 è stata:

1. riportata la distribuzione dei valori
2. identificato il 5° percentile quale limite di riferimento inferiore
3. definito il range entro cui cade il 95% dei valori.

Parametri	Valori di riferimento minimi*
Volume (ml)	1.5 (1.4-1.7)
n° spermatozoi/ejaculato	39 (33-46)
n° spermatozoi/ml (mil/ml)	15 (12-16)
Motilità totale (%)	40 (38-2)
Motilità progressiva (%)	32 (31-34)
Vitalità (spermatozoi vitali,%)	58 (55-63)
Morfologia (forme normali,%)	4 (3.0-4.0)
pH	≥7.2
Leucociti perossidasi-positivi (mil/ml)	<1.0
MAR test (% spermatozoi mobili con particelle adese)	<50
Immunobead test (% spermatozoi mobili con sferule adese)	<50

*: 5° percentile e intervallo di confidenza del 95%

Distribuzione dei valori per i parametri seminali relativi a uomini le cui partner hanno concepito spontaneamente entro 12 mesi (time-to-pregnancy) dalla sospensione dell'uso di metodi contraccettivi.

Parametri	N	Percentili								
		2.5	5	10	25	50	75	90	95	97.5
Volume (ml)	1941	1.2	1.5	2.0	2.7	3.7	4.8	6.0	6.8	7.6
n° spermatozoi/ejaculato	1859	23	39	69	142	255	422	647	802	928
n° spermatozoi/ml (mil/ml)	1859	9	15	22	41	73	116	169	213	259
Motilità totale (%)	1781	34	40	45	53	61	69	75	78	81
Motilità progressiva (%)	1780	28	32	39	47	55	62	69	72	75
Motilità non progressiva (%)	1778	1	1	2	3	5	9	15	18	22
Spermatozoi immobili (%)	1863	19	22	25	31	39	46	54	59	65
Vitalità (spermatozoi vitali,%)	468	53	58	64	72	79	84	88	91	92
Morfologia (forme normali,%)	1851	3	4	5.5	9	15	24.5	36	44	48

Differenti colorazioni degli spermatozoi visti al microscopio

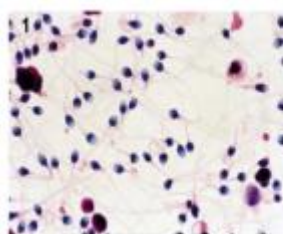


Fig. 1. Spermatozoi stained with H-E (H&E 130).



Fig. 3. Spermatozoi stained with Wright's Special Hematoxylin.

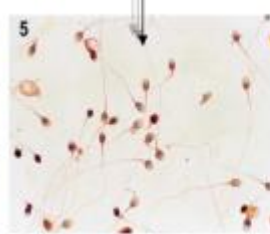


Fig. 5. Spermatozoi stained with Papapanicolaou.



Fig. 7. Spermatozoi stained with Silver.

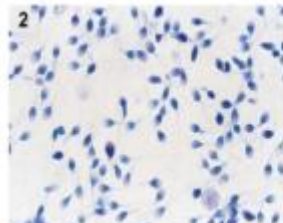


Fig. 2. Spermatozoi stained with TB.



Fig. 4. Spermatozoi stained with Orange G.

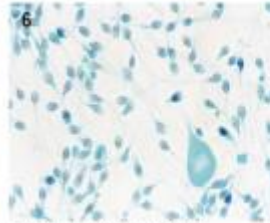


Fig. 6. Spermatozoi stained with Light Green.

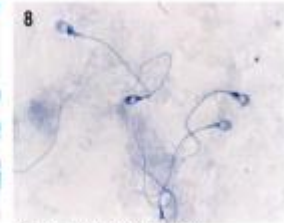


Fig. 8. Spermatozoi stained with Janus Green.

IL VARICOCELE

Il varicocele (dal latino varix-icis = varice e dal greco kele = gonfiore) è un'affezione caratterizzata dalla dilatazione e dall'allungamento con abnorme tortuosità delle vene del funicolo spermatico e dello scroto.

Le prime osservazioni risalgono a Celso, nel primo secolo dell'era cristiana, e già a quel tempo si constatava una frequente ipotrofia del testicolo al medesimo lato della varicosità. Fu nel 1880 che Barfield, chirurgo inglese, ebbe a segnalare la possibile correlazione tra varicocele ed infertilità, ma solo con gli studi di Tulloch del 1952' e di McLeod del 19652 si constatò che era possibile riscontrare un miglioramento della spermatogenesi in un paziente dispermico dopo correzione del varicocele.

L'incidenza di questa patologia è molto alta e le percentuali (dal 7,6% al 30,7%) riportate variano notevolmente secondo le fonti di provenienza, il numero di soggetti esaminati ed il range di età considerato.

Il varicocele è molto più frequente a sinistra e ciò è in rapporto alla differente anatomia vascolare tra destra e sinistra.

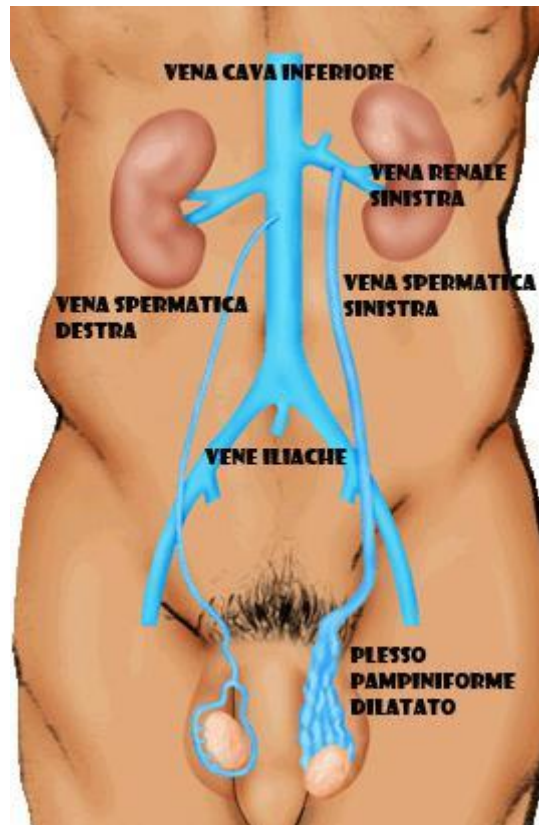
ANATOMIA

La vascolarizzazione arteriosa del testicolo è rappresentata dall'arteria testicolare che costituisce la fonte principale di apporto sanguigno, dall'arteria deferenziale (ramo della arteria vescicale inferiore), che costituisce la fonte pelvica e dall'arteria cremasterica.

Il drenaggio venoso del testicolo e delle vie spermatiche è rappresentato principalmente dalle vene testicolari o spermatiche. A livello scrotale le numerose vene deputate al drenaggio del sangue refluo formano due gruppi di vene, uno anteriore ed uno posteriore.

Il gruppo anteriore (rispetto al deferente) costituisce il plesso pampiniforme, cosiddetto per l'andamento tortuoso, plessiforme delle vene che ne fanno parte e che vanno a costituire le vene testicolari o spermatiche interne. All'origine le

vene testicolari sono numerose, mentre alla terminazione sono generalmente due, la vena spermatica destra e la spermatica sinistra; originano a livello della borsa scrotale e terminano a livello della vena cava inferiore a destra e nella vena renale a sinistra.



Anatomia vascolare del varicocele

Il gruppo venoso posteriore, costituito da 4 o 5 vene di diametro inferiore alle vene del gruppo anteriore, si stacca dalla faccia mediale del corpo e della coda dell'epididimo. Nel tragitto inguinale queste vene si raggruppano in due o in una sola vena, che perde contatto con il deferente a livello dell'anello inguinale interno per drenare nella vena epigastrica inferiore. I due gruppi possono comunque essere anastomizzati fra di loro tramite alcuni rami minori. Esiste, inoltre, un sistema di drenaggio superficiale rappresentato dalle vene scrotali anteriori e posteriori, che sboccano nella vena safena.

FISIOPATOLOGIA E CLINICA

Il varicocele può essere primitivo o secondario: il primitivo o idiopatico che si manifesta in genere nei giovani adulti in assenza di qualsiasi altra patologia che ne possa spiegare la patogenesi; il secondario colpisce tutte le età e la sua insorgenza è legata al blocco completo o incompleto del ritorno venoso didimo-epididimario, per una patologia che interessa direttamente i vasi o gli organi retro o intraperitoneali. Il varicocele secondario può essere considerato solo un sintomo di altri processi patologici, talora a prognosi infausta.

A seconda della dilatazione delle vene a livello scrotale, Amelar e Dubin hanno classificato clinicamente il varicocele primitivo in diversi gradi:

I grado: varicocele evocabile e palpabile solo facendo compiere al paziente una manovra di Valsalva;

II grado: varicocele palpabile anche in assenza di manovra di Valsalva;

III grado: varicocele evidenziabile già all'ispezione.

La classificazione ecografica secondo Sarteschi del 1993 è probabilmente la più attendibile:

Grado 1: non si osservano varicosità in B-mode. L'ECD, con sonda posizionata all'emergenza scrotale, evidenzia un prolungato reflusso venoso.

Grado 2: si osservano piccole varicosità posteriori, spesso accompagnate da un tronco venoso rettilineo ventrale, che però non scendono al di sotto del livello del polo superiore del testicolo. Le varicosità incrementano di diametro in maniera più o meno apprezzabile con la manovra di Valsalva eseguita in B-Mode. Lo studio con ECD rivela la presenza di reflusso venoso nella regione sovratesticolare.

Grado 3: in ortostatismo i vasi venosi si dilatano prontamente durante manovra di Valsalva in B-Mode, raggiungendo il polo inferiore del testicolo. L'ECD non

evidenzia reflusso in condizioni basali ma dimostra reflussi prolungati durante manovra di Valsalva.

Grado 4: i vasi venosi del funicolo appaiono dilatati in B-Mode a livello funicolare peritesticolare; la manovra di Valsalva determina un ulteriore allargamento dei calibri venosi. Lo studio ECD documenta presenza di reflussi patologici già in condizioni basali, incrementabili durante manovra di Valsalva. Spesso può essere presente ipotrofia del testicolo omolaterale.

Grado 5: i vasi venosi appaiono estremamente dilatati in B-Mode a livello funicolare e peritesticolare, talvolta in maniera abnorme. La manovra di Valsalva determina aumento del calibro venoso. L'ECD dimostra un reflusso patologico presente in condizioni basali che comunque non incrementa o incrementa pochissimo durante l'esecuzione delle manovre funzionali.

EZIOPATOGENESI

L'eziopatogenesi del varicocele primitivo non è ancora ben conosciuta. Sono stati ipotizzati diversi fattori, ma nessuno sembra spiegare in modo definitivo tutti i casi di varicocele.

Analogamente alle varici essenziali, anche per il varicocele sembra che siano necessari, per la sua insorgenza, fattori predisponenti e fattori determinanti. Tra i primi si è voluto mettere in risalto la particolare predisposizione alla flebectasia delle vene scrotali, un'insufficienza anatomica del muscolo cremastere e altri fattori predisponenti sono stati evidenziati dagli studi anatomici della circolazione artero-venosa didimo-epididimaria. Si è così voluto attribuire valore eziologico allo sbocco ad angolo retto della vena spermatica sinistra nella vena renale omolaterale; alla compressione intermittente della pinza aorto-mesenterica sulla vena renale sinistra (nut-cracker); alla maggior pressione esistente nella vena renale sinistra rispetto alla vena cava; alla compressione della vena iliaca di sinistra da parte dell'arteria iliaca di destra, che passa anteriormente ad essa. Avviene, in quest'ultima situazione, un'inversione del flusso ematico refluo

dall'arto inferiore sinistro attraverso rami della safena e delle vene cremasteriche verso la vena spermatica esterna (nut-cracker basso).

DIAGNOSI

Il varicocele primitivo è di solito asintomatico. Spesso viene diagnosticato in corso di esame sistemico del paziente. La rara sintomatologia soggettiva non è, in genere, proporzionata alla gravità della malattia e, quando presente, è rappresentata da un senso di peso scrotale e da lievi dolori irradiati al perineo e all'inguine. Non raramente questa sintomatologia si manifesta durante sforzi.

Per una prima diagnosi di varicocele solitamente è sufficiente un attento esame obiettivo. All'ispezione del paziente, in posizione ortostatica, l'emiscroto sinistro si presenta pendulo, più grosso e più basso del controlaterale, spesso con numerose varicosità superficiali che si riducono quando il paziente è in clinostatismo. La palpazione solitamente conferma i dati ispettivi. In alcuni casi un varicocele non apprezzabile alla semplice palpazione può essere diagnosticato facendo eseguire al paziente la manovra di Valsalva e palpando contemporaneamente il sacco scrotale (1° grado clinico). La flussimetria Doppler (o ecocolorDoppler), è utile anche in caso di varicocele clinicamente evidente, per precisare il tipo di varicocele e poter porre l'indicazione più appropriata alla correzione, onde evitarne la persistenza.

È utile, inoltre, far eseguire al paziente degli esami ormonali ed un esame del liquido seminale, soprattutto quando il paziente si inserisce in un contesto di infertilità di coppia.

Ecotomografia scrotale

Nei pazienti con varicocele si rileva, cranialmente al polo superiore del testicolo, una massa strutturata, con numerose formazioni tubulari che presentano sensibili variazioni di diametro durante l'esecuzione di manovra di Valsalva e nel cui contesto è presente un flusso ematico discontinuo. Nelle forme più gravi è

possibile visualizzare vasi ectasici anche al di dietro della testa dell'epididimo o verso la coda.

Ma, l'ecotomografia scrotale, in caso di varicocele, si rende necessaria soprattutto per valutare un'eventuale ipotrofia testicolare.

Flussimetria Doppler

L'esame flussimetrico Doppler è l'esame principe nella diagnostica strumentale del varicocele. Le finalità dell'indagine sono: porre diagnosi nelle forme subcliniche, valutare l'entità e il tipo di un varicocele clinico, individuare i circoli collaterali, effettuare i controlli a distanza.

L'esecuzione dell'esame prevede due momenti: uno in clinostatismo ed uno in ortostatismo. I siti di esplorazione sono il cordone spermatico, il canale inguinale e la giunzione safeno-femorale. L'esame viene sempre effettuato in basale e dinamicamente (durante l'esecuzione di manovra di Valsalva).

Della classificazione ecografica del varicocele abbiamo già detto in precedenza.

VARICOCELE ED INFERTILITÀ

Il meccanismo con cui il varicocele causa infertilità non è mai stato esattamente appurato. Una teoria plausibile è quella che ne attribuisce gli effetti all'incompetenza valvolare ed al flusso sanguigno retrogrado lungo le vene spermatiche. Diversi studi hanno dimostrato che la dimensione del varicocele non ha influenza sui risultati ottenuti dopo la sua correzione. Al contrario, si pensa che la dimensione dei testicoli sia ben correlata con la qualità del seme e la fertilità.

Lo studio dell'infertilità maschile risulta complicato dal fatto che l'infertilità è un fenomeno multifattoriale nel singolo individuo e inoltre è correlato a fattori di coppia. Per quanto riguarda il varicocele sono state proposte tre differenti teorie:

- inibizione del sistema termoregolatore del plesso pampiniforme con conseguente incremento della temperatura scrotale;

- reflusso di steroidi di provenienza surrenalica o di tossine renali verso il testicolo attraverso la vena spermatica interna;
- stasi ematica a livello testicolare che condurrebbe all'anossia con distruzione tissutale e/o indebolimento delle funzioni epididimarie.

Se fosse vero che il danno testicolare è esclusivamente dovuto all'ipertermia o al reflusso di cataboliti tossici, l'esistenza di una connessione tra il sistema testicolare venoso destro e quello sinistro sarebbe sufficiente a rispondere alla domanda.

La correzione chirurgica del varicocele è molto dibattuta in quanto non vi è accordo tra gli Autori dei diversi paper scientifici, se abbia o no un reale vantaggio sulla fertilità. Negli ultimi anni si tende a credere che le condizioni "ideali" del liquido seminale si riscontrano raramente allorché esista un'infertilità da varicocele: in questi pazienti di regola è presente una oligoastenospermia più o meno accentuata.

In generale possono essere tracciate alcune valutazioni sulle seguenti variabili:

- Età: in genere molti Autori fissino a 35 anni il limite per una valida correzione del varicocele, ma una correzione anche in età più avanzata può offrire i suoi vantaggi
- Esame del liquido seminale: la presenza di un varicocele incide soprattutto sulla motilità degli spermatozoi ma può arrecare danni anche al numero e alla forma. La correzione abitualmente porta ad un miglioramento di questi parametri.
- Tendenza all'abortività della partner: dopo la correzione del varicocele diminuisce sensibilmente il numero degli aborti spontanei.

TERAPIA

Il trattamento del varicocele ha come scopo principale quello di migliorare la spermatogenesi o di prevenire un suo deterioramento futuro. Il rilievo clinico di varicocele non implica necessariamente l'intervento, se non quando esso sia associato ad alterazioni della spermatogenesi o queste si possano prevedere sulla base di un arresto di crescita del testicolo che presenta varicocele.

Trattamento chirurgico

I procedimenti chirurgici tradizionali più comunemente usati sono:

Tecnica di Ivanisevich - Tale tecnica gode ancora di ampia diffusione; essa prevede l'incisione qualche centimetro al di sopra della spina iliaca anterosuperiore, l'incisione/divaricazione dei muscoli, lo scollamento del sacco peritoneale e l'isolamento del funicolo. Si procede quindi alla legatura delle vene ectasiche, avendo cura di risparmiare l'arteria testicolare.

Tecnica di Palomo - Per l'esecuzione di tale tecnica l'incisione viene eseguita 5 cm al di sopra della spina iliaca anterosuperiore, perché a questo livello è più agevole il riconoscimento delle collaterali alte reno-spermatiche.

Trattamento microchirurgico

L'utilizzo della microchirurgia nella terapia del varicocele può essere inteso sia come uso dei mezzi di ingrandimento al fine di eseguire meglio interventi chirurgici tradizionali, con lo scopo di non tralasciare alcuna vena ectasica (riducendo così la percentuale di persistenza del varicocele) e di salvaguardare l'integrità dell'arteria testicolare e dei linfatici, sia per realizzare vie alternative di deflusso che permettano la conservazione del ritorno venoso dal testicolo oltre che l'abolizione del reflusso nella vena spermatica interna.

Legatura microchirurgica sec. Goldstein - Il vantaggio di questo tipo di intervento rispetto agli interventi tradizionali è rappresentato dal poter effettuare agevolmente l'intervento in anestesia locale grazie ad una aggressione bassa del funicolo al di sotto dell'anello inguinale esterno. Lo svantaggio di trovare a questo livello molteplici vene con una disposizione spesso plessiforme viene superato dalla utilizzazione sistematica del microscopio operatore a medio ingrandimento.

Intervento di Marmar - Anche questo intervento presenta il vantaggio, rispetto ai metodi classici, di poter essere eseguito agevolmente in anestesia locale. Attraverso un'incisione di 2 cm si isola il funicolo immediatamente al di sotto dell'anello inguinale esterno. Si identificano le strutture come nell'intervento descritto precedentemente, avvalendosi per l'identificazione dell'arteria della

papaverina ma, dopo aver legato le vene di maggiori dimensioni, si procede all'iniezione, all'interno di una vena di piccole dimensioni, di una quantità limitata di sostanza. La vena punta viene chiusa con una piccola emoclip.

Intervento di Ishigami - Consiste nella creazione di un'anastomosi tra il capo testicolare della vena spermatica interna e la vena grande safena omolaterale. Qualora il reflusso coinvolga anche la componente cremasterica e deferenziale, possono verificarsi complicanze postoperatorie dovute al plesso venoso residuo. Talvolta l'anastomosi è resa impossibile dalle ramificazioni della vena spermatica interna in diversi rami collaterali di piccolo calibro.

Trattamento video laparoscopico

L'indicazione della videolaparoscopia è limitata al varicocele bilaterale.

L'intervento comprende incisione del peritoneo con taglio a T lateralmente al funicolo spermatico, identificazione delle vene e dell'arteria mediante scollamento delle strutture funicolari, posizionamento di clip metalliche sulle vene risparmiando l'arteria testicolare, revisione dell'emostasi al fine di prevenire la formazione di un emoperitoneo.

Trattamento percutaneo

Per terapia percutanea del varicocele si intende l'occlusione della vena spermatica da un accesso vascolare e mediante manovre endourologiche che, per mezzo di un amplificatore di brillantezza, consentono l'identificazione del circolo patologico e del reflusso. L'occlusione della o delle vene spermatiche si può ottenere mediante sclerotizzazione (lesione intinale, introduzione di sostanze sclerosanti) o embolizzazione (liberazione nel lume della vena di emboli autologhi o eterologhi allo scopo di ottenere l'occlusione). Le due manovre possono essere combinate tra di loro e in tal caso si parla di scleroembolizzazione.

Il vantaggio degli sclerosanti rispetto agli emboli sta essenzialmente nell'evitare il rischio di mobilizzazione. Le sostanze sclerosanti provocano una reazione

endoteliale favorevole e non pericolosa, una sorta di "flebite chimica" cui consegue ugualmente l'occlusione del lume.

Tecnica venografica

La venografia renale selettiva e superselettiva delle vene spermatiche viene seguita per mezzo di un fluoroscopio.

La presenza di anomalie dell'albero venoso può rendere più difficile una manovra venografica in genere facile. È normale che nella vena renale sinistra confluiscono, oltre alla spermatica, tronchi venosi di una certa portata, quali la vena surrenale e l'arco anastomotico renolombare di Lejars.

Il mancato cateterismo superselettivo della vena spermatica è, in ogni caso, causa di insuccesso della manovra in quanto, anche in presenza di un reflusso, non è consigliabile iniettare sostanze sclerosanti nella vena renale.

La tecnica di sclerotizzazione si differenzia in base alla situazione angiografica riscontrata. Nel caso di un'unica grossa vena refluenta, che percentualmente è il meno frequente, si crea una lesione dell'intima mediante guida a J; si può notare, in questa fase, uno spasmo della vena che non deve essere confuso con l'occlusione definitiva della stessa. A questo punto si procede con l'iniezione transcatetere della sostanza sclerotizzante (ad es. 2 fiale di Trombovar al 3% non diluito). Si lascia poi alla sostanza il tempo di avere effetto e dopo circa 5' si controlla l'avvenuta occlusione. In caso contrario, si può procedere alla ripetizione della stessa manovra. Il riscontro più frequente è però quello di vene multiple di diverso calibro che sono la causa delle "recidive" chirurgiche, in quanto spesso si verifica l'evenienza di un ramo più grosso interrotto dalla legatura e di rami più piccoli refluenti che alimentano la persistenza del varicocele. In questi casi, non essendo talora possibile cateterizzare superselettivamente i rami di calibro minore, la sostanza sclerosante viene iniettata a monte della biforcazione, in modo da raggiungere i rami minori e da ottenere un'occlusione distale. Durante queste manovre può avvenire che le guide angiografiche provochino una rottura della parete della vena (che si manifesta con la fuoriuscita del mezzo di contrasto); tale evenienza provoca una sensazione

dolorosa al paziente e non garantisce la sicurezza dell'occlusione, essendo possibile una ricanalizzazione dello stravaso che si viene a creare.

Vi sono, infine, casi di inserzione anomala della vena spermatica che possono provocare anche a sinistra le stesse difficoltà di cateterismo superselettivo che esistono comunemente per la vena spermatica di destra.

Nell'impossibilità di ottenere un cateterismo della vena, occorre soprassedere alla scleroembolizzazione per via retrograda e sarà opportuno eseguire uno studio venografico per via anterograda ed una sclerotizzazione sec. Tauber.

Il cateterismo delle vene spermatiche destre è più complesso, in quanto non vi è una regolarità di sbocco come avviene a sinistra. Esistono cateteri con curvatura apposita che facilitano la manovra; essa può essere eseguita bilateralmente anche in tempo unico. Una volta eseguito il cateterismo super-selettivo, le tappe successive ricalcano la metodica adottata a sinistra.

L'avvenuta chiusura della vena spermatica viene facilmente documentata in amplificatore con la visualizzazione della scomparsa del reflusso.

Le dimostrazioni venografiche intraoperatorie della complessità del circolo venoso hanno dimostrato che, a differenza di quanto viene riferito dai manuali di anatomia, spesso è costituito da diverse vene già a livello lombare che si anastomizzano in vario modo tra di loro e con i circoli venosi contigui. La dimostrazione di vene di piccolo calibro che decorrono parallelamente a una vena spermatica interna maggiore ha convalidato l'ipotesi secondo la quale spesso, nel corso delle legature chirurgiche, si identifica e seziona il ramo maggiore, lasciando integri rami minori che sono la causa della persistenza del reflusso. Per questo alcuni Autori hanno proposto l'esecuzione di una dimostrazione venografica pre o intraoperatoria del circolo venoso.

RAZIONALE DELLO STUDIO

Lo sperma ha esigenze molto elevate di energia per completare le diverse fasi del ciclo vitale che comprendono la maturazione e la capacitazione.

Sono molti i fattori che influenzano la qualità dello sperma attraverso la diminuzione della disponibilità energetica, provocata dalla disfunzione mitocondriale. Lo sperma è anche vulnerabile ai ROS perché la membrana plasmatica e il citoplasma sono ricchi di acidi grassi polinsaturi.

ROS → danni alla membrana → instabilità della membrana → alterazioni funzionali → morte cellulare

concentrazioni moderatamente elevate di ROS → immobilizzazione dello sperma

concentrazioni elevate di ROS → perossidazione lipidica → morte cellulare

È noto che alti livelli di stress ossidativo negli spermatozoi correlano con:

- riduzione della produzione complessiva di sperma;
- perdita di motilità degli spermatozoi a causa della diminuita produzione di energia;
- perdite della reazione acrosomiale a causa del cross-linking proteico e della perossidazione lipidica;
- alterazione della fusione spermatozoo-oocita a causa della perdita di fluidità di membrana;
- frammentazione del DNA spermatico;
- anomalie nella morfologia degli spermatozoi.

Sperma e apoptosi

I pazienti infertili hanno più alti livelli di ROS nel loro plasma seminale e un incremento dell'apoptosi rispetto ai soggetti con indice di fertilità nella norma; i pazienti infertili hanno maggiori danni allo sperma provocato dai ROS e più elevati livelli di molecole proapoptotiche (cyt C, caspasi 3 e 9) che indicano danno mitocondriale, aumentata apoptosi e danno al DNA.

I composti naturali inclusi nella formulazione dell'integrato da noi utilizzato agiscono in sinergia:

L-carnitina e *acetil-L-carnitina* svolgono un ruolo importante nel metabolismo energetico degli spermatozoi. Molti studi clinici hanno dimostrato che la loro somministrazione per via orale nei soggetti astenoteratozoospermici aumenta la percentuale di spermatozoi mobili, la motilità progressiva rapida, la velocità media e la morfologia dello sperma. La sua somministrazione aumenta anche il numero totale di spermatozoi per eiaculato.

Fruttosio e *acido citrico* sono anch'essi substrati metabolici che producono energia. Il loro dosaggio può anche essere utilizzato anche come indicatori di funzionalità spermatica.

Il *selenio* è un componente essenziale di diverse vie metaboliche principali: difesa antiossidante sistemica, metabolismo degli ormoni tiroidei, funzione immunitaria, ecc. E' necessario per l'azione della perossidazione del glutathione (importante sistema enzimatico antiossidante). La carenza di glutathione può portare a instabilità del corpo dello spermatozoo, con conseguente alterazione della motilità. La selenoproteina, una proteina dipendente dal selenio, è localizzata nella porzione centrale dello spermatozoo e si pensa abbia una funzione di stabilizzazione per l'integrità del flagello spermatico.

Il *coenzima Q10* è concentrato nei mitocondri del corpo degli spermatozoi. I livelli di Co Q10 mostrano una correlazione significativa con il numero degli spermatozoi e con la motilità spermatica. Il Co Q10 può essere carente nei pazienti affetti da varicocele e ciò che porta a una maggiore sensibilità allo stress ossidativo. La somministrazione di Co Q10 a uomini infertili con

astenozoospermia idiopatica comporta un aumento della motilità degli spermatozoi.

I livelli di *vitamina C* nel plasma seminale sono legati alla dieta e valori bassi possono portare alla sterilità oltre che al danno del materiale genetico degli spermatozoi. La vitamina C protegge anche il citoplasma e il DNA nucleare dal ricorrente danno ossidativo.

Lo *zinco* è essenziale per la sintesi dei coenzimi che mediano la sintesi biogenico-amminica e per il metabolismo. Bassi livelli di zinco nel plasma seminale sono un indicatore di disfunzione secretoria della prostata. Alcuni studi suggeriscono che lo zinco può essere più efficace in sinergia con l'acido folico. Le basse concentrazioni di folati nel plasma seminale sono state associate con una bassa densità di spermatozoi e scarsa conta spermatica. La terapia integrativa con zinco ha dimostrato di aumentare il testosterone, il numero di spermatozoi e la motilità.

La *vitamina B12* è coinvolta nella genesi dei globuli rossi del sangue, in particolare nella maturazione delle cellule e nella sintesi del DNA. La carenza di vitamina B12 è stata associata con un ridotto numero di spermatozoi e con la bassa motilità.

Il ruolo degli integratori specifici per la fertilità maschile è ormai consolidato e stabilito da diversi trials clinici. Un numero cospicuo di studi recenti ha mostrato un miglioramento della conta spermatica e della motilità degli spermatozoi utilizzando associazioni di carnitine, zinco, selenio e vitamina B12. Numerosi antiossidanti quali la vitamina C, il selenio e il coenzima Q10 sono stati segnalati per avere un ruolo nel trattamento dell'infertilità maschile.

La formulazione dell'integrato da noi utilizzato offre un equilibrio ottimale di sostanze nutritive per:

- migliorare la maturazione degli spermatozoi e la funzione (zinco, acido folico, vitamina B12, acetil L-carnitina);

- migliorare e proteggere il metabolismo energetico (L-carnitina, acetil L-carnitina, fruttosio, acido citrico);
- proteggere lo sperma dai danni provocati dai radicali liberi (selenio, coenzima Q10, vitamina C, zinco, acetil L-carnitina);
- proteggere lo sperma dall'apoptosi (L-carnitina).

SCOPO E OBIETTIVI

Lo scopo di questo studio è quello di valutare l'efficacia di un integratore alimentare, disponibile in commercio, contenente una combinazione di L-carnitina e acetil L-carnitina a tutti gli altri composti sopra elencati. E' prevista una terapia di 6 mesi, realizzando un studio randomizzato placebo controllato in doppio-cieco.

L'obiettivo di questo studio è quello di determinare l'efficacia dell'integratore sulla qualità dello sperma nei soggetti con oligoastenoteratozoospermia, con e senza varicocele, con storia di difficoltà a concepire. In particolare per valutare l'effetto di una combinazione naturale di antiossidanti sui parametri spermatici (motilità, morfologia, conta).

MATERIALI E METODI

Abbiamo realizzato uno studio no-profit, monocentrico, randomizzato, in doppio cieco, placebo controllato focalizzato su uomini con difficoltà a concepire da almeno 12 mesi e con diagnosi clinica e strumentale di presenza o assenza di varicocele oltre che conferma biochimica di oligoastenoteratozoospermia idiopatica.

Un totale di 104 pazienti sono stati reclutati; 52 hanno effettuato terapia con l'integratore e 52 hanno assunto il placebo.

E' stata valutata l'efficacia di 6 mesi di terapia somministrata tramite 2 bustine al dì (1 al mattino 1 alla sera).

I pazienti sono stati ulteriormente divisi in due gruppi: 52 con varicocele di grado I-IV e 52 non affetti da varicocele.

E' stata programmata una valutazione del liquido seminale prima dell'inizio del trattamento (Visita T-1) per esaminare i parametri seminali di ciascuno soggetto (in accordo con i parametri del WHO 2010). Alla fine del trattamento (Visita 2 - 6 mesi) è stato effettuato un ulteriore spermioγραμμα per valutare i parametri finali.

VISITA T-1 (screening)

I pazienti sono stati visitati e valutati in accordo con i criteri di inclusione ed esclusione. Sono stati invitati a partecipare allo studio ed hanno firmato il consenso informato.

Questa visita in alcuni casi si è sovrapposta a quella basale se tutti i dati richiesti per l'arruolamento erano disponibili.

Durante questa visita i pazienti sono stati sottoposti alle seguenti valutazioni:

- Dati demografici (età, peso, altezza);
- Esame fisico, segni vitali e pressione sanguigna;
- Anamnesi remota e prossima;
- La concomitante assunzione di terapie farmacologiche;
- Analisi del liquido seminale.

VISITA T0 (basale)

La visita basale è stata effettuata entro 2 settimane dallo screening. Questa poteva sovrapporsi

allo screening se tutti i dati richiesti per l'iscrizione erano disponibili.

Durante questa visita l'investigatore ha controllato il rispetto dei criteri di inclusione/esclusione.

I pazienti che soddisfacevano i criteri sono stati randomizzati per ricevere il trattamento (integratore o placebo).

Al termine della visita al paziente è stata fornita la confezione contenente il placebo o l'integratore secondo lo schema di trattamento previsto per i primi 3 mesi.

VISITA 1

La visita 1 è stata effettuata a 3 mesi dalla visita basale.

Durante questa visita i pazienti sono stati sottoposti alle seguenti valutazioni:

- Esame clinico, valutazione dei segni vitali e della pressione sanguigna;
- Terapie concomitanti;
- Effetti collaterali;
- Controllo di conformità.

Al termine della visita è stato fornito il trattamento per gli ultimi 3 mesi.

VISITA 2

La visita 2 è stata effettuata a 6 mesi dalla visita basale.

Durante questa visita i pazienti sono stati sottoposti alle seguenti valutazioni:

- Esame clinico, valutazione dei segni vitali e della pressione sanguigna
- Terapia concomitanti;
- Effetti collaterali;
- Analisi del liquido seminale;
- Controllo di conformità.

POPOLAZIONE IN STUDIO

Tutti gli uomini sani di età compresa tra 18 e 50 anni che soddisfano i criteri di inclusione

erano eleggibili per lo studio.

Criteri di inclusione:

1. Uomini con (oligo)astenoteratozoospermia con e senza varicocele;
2. Uomini di età compresa tra i 18 e i 50 anni;
3. Uomini facenti parte di coppie con storia di difficoltà a concepire > 12 mesi;
4. Analisi del seme che dimostrava:
 - numero di spermatozoi totale ≤ 20 milioni per ml;
 - percentuale di spermatozoi con motilità progressivamente <50%;
 - indice di viscosità e leucociti nella norma;
 - volume dell'eiaculato totale superiore a 1,0 ml;
 - motilità degli spermatozoi $\leq 40\%$;
 - morfologia degli spermatozoi: forme normali $\leq 4\%$.
5. Partner femmina fertile che soddisfano tutti i seguenti criteri:
 - cicli mestruali regolari;
 - età <40;
 - partner femminili non in attesa di procedure quali l'inseminazione artificiale (IA) o fecondazione; in vitro (IVF) o intracitoplasmatica (ICSI) nei 90 giorni seguenti.
6. Consenso informato firmato e datato.

Criteri di esclusione:

1. Motilità degli spermatozoi <5%;
2. Concentrazione degli spermatozoi <1x10⁶/ml;
3. Volume seminale $\leq 1,0$ ml;
4. Soggetti con nota ipersensibilità agli ingredienti dell'integratore;
5. Storia di criptorchidismo;

6. Disturbi endocrini che interessano l'asse ipotalamo-ipofisario;
7. Storia della parotite postpuberale;
8. Presenza di anticorpi antispermatozoi;
9. Storia di vasectomia, orchiectomia, azoospermia ostruttiva o patologia ostruttiva del sistema urogenitale;
10. Storia di malattie endocrine, malattie autoimmuni o fibrosi cistica;
11. Storia di terapie per la sterilità entro gli ultimi 3 mesi;
12. Storia di cancro testicolare;
13. Storia di assunzione di droghe illecite e ricreative;
14. Storia di consumo eccessivo di alcol negli ultimi 90 giorni dalla screening;
15. Leucocitospermia: conta leucocitaria $> 1 \times 10^6/\text{ml}$;
16. Sierologia positiva per l'HIV;
17. Uso di agenti antiossidanti o vitamine entro 12 settimane dall'inclusione nello studio.

Per i soggetto che utilizzavano altra supplementazione era richiesto un periodo di wash-out di almeno 12 settimane prima dell'inserimento nello studio;

18. Il mancato rispetto di prescrizioni dietetiche dalla visita di screening fino alla visita finale:

evitare di utilizzare vitamine antiossidante, minerali o integratori a base di erbe tra cui la vitamina C, la vitamina E, flavonoidi, carotenoidi, selenio, etc;

19. Soggetti che hanno seguito una dieta particolare, comprese limitazioni proteiche, cibo crudo, diete vegetariane o vegane, etc;

20. Qualsiasi condizione che, a giudizio dello sperimentatore, poteva mettere il soggetto a rischio

nella partecipazione allo studio;

22. Soggetti coinvolti in altre sperimentazioni cliniche.

Criteri di uscita anticipata dallo studio:

1. Soggetti giudicati intolleranti alla terapia;

2. Soggetti che non hanno assunto per più di 3 giorni consecutivi completi la terapia, o un totale di 5 o più giorni completi al mese, o più di 10 dosi in un mese;
3. Soggetti che non sono stati in grado di completare il protocollo di 6 mesi;
4. Soggetti che hanno sviluppato uno qualsiasi dei criteri di esclusione durante il periodo di studio;
5. Soggetti che non hanno rispettato una qualsiasi delle osservazioni richieste.

TRATTAMENTO IN CORSO DI STUDIO

Ogni bustina di INTEGRATORE contiene i seguenti ingredienti:

L-carnitina fumarato: 1725 mg

Acetil-L-carnitina: 500 mg

Fruttosio: 1000 mg

Acido citrico: 50 mg

Selenio: 50 microg

Coenzima Q10: 20 mg

Vitamina C: 90 mg

Zinco: 10 mg

Acido folico: 200 microg

Vitamina B12: 1,5 microg

eccipienti

Saccarosio

Silice (antiagglomerante)

aroma di limone (sapore)

Acesulfame K (E950) (dolcificante)

Ogni bustina di PLACEBO contiene i seguenti ingredienti:

tutti gli ingredienti di cui sopra, con l'eccezione della L-carnitina, Acetil-L-carnitina, fruttosio, selenio, coenzima Q10, vitamina C, acido folico, zinco, vitamina B12 e acido citrico.

I due prodotti sono confezionati e impacchettati in maniera identica. Un numero identificativo è assegnato a ciascun prodotto.

REGIME DI DOSAGGIO

Sia l'integratore che il placebo sono preparati sotto forma di polvere da prendere due volte al giorno, mattina e sera. La polvere deve essere sciolto in circa 120 ml di acqua, bevanda o succo di frutta e l'intera preparazione consumata.

VALUTAZIONI DI CONFORMITA'

I soggetti devono essere istruiti, all'inizio dello studio, sul metodo più appropriato per assumere i prodotti. Hanno ricevuto una fornitura di tre mesi all'inizio dello studio e una fornitura di ulteriori tre mesi a seguire. Il numero di bustine avanzate è stato conteggiato allo scadere di ogni follow-up.

TERAPIE CONCOMITANTI

Tutti i pazienti hanno riceveranno le raccomandazioni del WHO circa i trattamenti (Rowe et al. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male, 2000).

Durante lo studio non sono stati ammessi: altre terapie concomitanti, FANS, antibiotici, vitamine o integratore noti per influenzare la qualità dello sperma.

PROCEDURE DI RANDOMIZZAZIONE

Assegnazione ai gruppi

L'assegnazione causale è stata effettuata utilizzando il programma nQuery Advisor nTerim 2.0 (2012). Avendo programmato lo studio sulla base di due popolazioni (varicocele e non varicocele) sono state rilasciate due liste di

randomizzazione separate. I soggetti sono stati assegnati in modo casuale a uno dei due regimi di trattamento (integratore o placebo).

Doppio cieco

Questo è uno studio in doppio cieco e nè il paziente, i fornitori, gli investigatori responsabili della raccolta dei dati, gli analizzatori dei campioni in laboratorio era a conoscenza per quanto riguarda l'assegnazione al gruppo placebo o al gruppo integratore. Un file è stato mantenuto sotto la responsabilità del ricercatore principale che ha fornito l'identificazione del prodotto per ogni soggetto.

PROCEDURE DI LABORATORIO

Analisi del seme

I campioni di sperma sono stati raccolti dopo masturbazione e dopo 3-5 giorni di astinenza sessuale. Le principali variabili valutate sono state: il volume eiaculato, la conta totale degli spermatozoi, la motilità progressiva, la motilità totale e la morfologia degli spermatozoi.

La morfologia degli spermatozoi è stata valutata tramite la procedura di colorazione sec. Giemsa.

La classificazione della motilità è stata effettuata secondo il metodo del WHO (2010 guidelines 5th Edition). La morfologia è stata valutata con il metodo del Kruger.

Tutti gli altri parametri spermatici valutati, seguendo le linee guida WHO del 2010, sono:

- aspetto;
- volume del liquido seminale;
- viscosità;
- la concentrazione di spermatozoi;
- numero totale di spermatozoi;
- percentuale spermatozoi mobili;

- grado di progressione in avanti (a, b, c o d - OMS, 2010);
- pH.

La seguente analisi è stata affidata ad un laboratorio di seminologia esterno. I campioni biologici saranno spediti in due volte, all'inizio e alla fine dello studio. I risultati delle analisi sono stati poi inviati direttamente allo sperimentatore.

Tutte le analisi sono state effettuate sia sui pazienti nel braccio di terapia che in quello del placebo.

METODI DI VALUTAZIONE

Efficacia

I risultati dell'analisi dei campioni seminale ad ognuno dei 2 periodi di osservazione sono stati confrontati esaminando i cambiamenti nei parametri tra ogni intervallo di osservazione, sia per i pazienti trattati con integratore che per coloro che erano stati assegnati al placebo.

Endpoints primari

- Motilità spermatica.

Endpoints secondari

- conta spermatica totale;
- morfologia spermatica;
- pregnancy rate.

SICUREZZA

Ogni paziente è stato monitorizzato e sono stati segnalati ad ogni visita di controllo i reclami. Tutti gli effetti collaterali sono stati riportati sulle schede CRF.

ACQUISIZIONE DEI DATI

Registrazione dei dati

Ad ogni paziente è stata compilata una scheda CRF (Case Report Form) con tutti i dati richiesti. Ad ogni soggetto è stato assegnato un numero identificativo all'inizio del processo di arruolamento. Una copia della scheda di raccolta dati, degli esami dello sperma e del modulo di consenso informato sono stati conservati per il nostro Istituto.


Archivio dati

I dati dei pazienti sono stati mantenuti strettamente confidenziali. Tutti i moduli identificano i pazienti solo ed esclusivamente tramite il loro numero identificativo personale.

Modulistica

- scheda di raccolta dati dei pazienti CRF (Case Report Form);
- modulo di consenso informato;
- approvazione del Board e del Comitato Etico dell'Istituto.

Alcune parti della CRF

 SAPIENZA UNIVERSITÀ DI ROMA	Dipartimento di Ginecologia, Ostetricia e Scienze Urologiche Università di Roma La Sapienza	Prot. PXP-001A
---	---	----------------

SCHEDA RACCOLTA DATI

STUDIO PROSPETTICO, RANDOMIZZATO, IN DOPPIO CIECO VS PLACEBO CON
INTEGRATORE ALIMENTARE (PROXEED), IN PAZIENTI CON DIAGNOSI DI
(OLIGO)-ASTHENO-TERATOZOOSPERMIA, CON E SENZA VARICOCELE

Protocollo PXP-001A

Versione 1.0 del 15 luglio 2013


SPERIMENTATORE

Prof. Vincenzo Gentile

Dipartimento di Ginecologia,
Ostetricia e Scienze Urologiche
Università degli Studi di Roma
"La Sapienza"

PAZIENTE N.

(Inserire il numero di randomizzazione)

 SAPIENZA UNIVERSITÀ DI ROMA	Dipartimento di Ginecologia, Ostetricia e Scienze Urologiche Università di Roma La Sapienza	Prot. PXP-001-A
	Centro n. 01	Paziente n. __ __

VISITA -1 DI SCREENING <i>(max 15 giorni prima della visita basale)</i>	DATA DELLA VISITA __ __ __ __ __ __ __ __ <i>gg mm aaaa</i>
---	--

Data di nascita __ __ __ __ __ __ __ __ <i>gg mm aaaa</i>	Data di firma del Consenso Informato __ __ __ __ __ __ __ __ <i>gg mm aaaa</i>
--	---

SEGNALI VITALI

NE ☐

Altezza	__ __ __ cm	Peso	__ __ __ kg
Frequenza cardiaca	__ __ __ bpm	PA Sistolica	__ __ __ mmHg
		PA Diastolica	__ __ __ mmHg

ESAME OBIETTIVO

NE ☐

APPARATO	N	A	NE	Se Anormale, descrivere l'anormalità
Stato generale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Uditivo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Visivo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Respiratorio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Cardiovascolare	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Gastroenterico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Muscolo-scheletrico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Genito-urinario	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Linfonodale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Neurologico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Endocrinologico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Dermatologico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Altro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____

N = Normale; A = Anormale; NE = Non Eseguito;

ANALISI STATISTICA

DIMENSIONI DEL CAMPIONE

La dimensione del campione è stata calcolata tenendo conto dell'endpoint primario dello studio, vale a dire la motilità spermatica rilevata all'inizio e alla fine dello studio.

ANALISI DEI DATI

Le analisi sono state effettuate utilizzando SAS da uno statistico qualificato e indipendente, è stato scelto un livello di significatività pari a 0,05.

STATISTICA DESCRITTIVA

Tutte le variabili parametriche sono riportate come media, deviazione standard, valori minimi e massimi. Le variabili discrete e nominali sono riportate come frequenza e percentuale nelle tabelle di contingenza.

STATISTICA INFERENZIALE

Omogeneità basale di gruppi: per le variabili continue l'omogeneità basale dei gruppi è stata testata tramite le analisi della varianza (ANOVA) su due livelli (terapia e presenza di varicocele); mentre per le variabili discrete e nominali è stato testato mediante l'analisi log-linear per le tabelle a più vie o tramite analisi step-wise.

ENDPOINTS PRIMARI

La percentuale di spermatozoi mobili osservata alla fine del periodo di trattamento è stata valutata mediante l'analisi di covarianza usando un modello

con due livelli di classificazione. In questa analisi, la variabile indipendente è la motilità rilevata alla visita basale, mentre la variabile dipendente è la percentuale rilevata alla fine del trattamento.

ENDPOINTS SECONDARI

Per esaminare eventuali modifiche durante il periodo di studio all'interno dei gruppi, tra i gruppi e le loro interazione, le variabili continue sono state valutate mediante l'analisi della varianza (ANOVA) per misure ripetute (tempo) con due criteri di classificazione (trattamento, varicocele).

Le variabili nominali e discrete sono state valutate tramite analisi log-lineare per le tabelle a più vie.

CONSENSO INFORMATO E VALUTAZIONI ETICHE

CONSENSO INFORMATO

E' stata cura degli esaminatori e di chi raccoglieva i dati di ottenere da ogni singolo paziente il consenso informato dopo un'esaustiva esplicazione a coloro che accettavano l'arruolamento. Tutto è stato fatto in accordo con i requisista normativi locali e nazionali.

CONSIDERAZIONI ETICHE

Il protocollo e i suoi allegati sono stati oggetto di revisione e approvazione da parte del Comitato Etico.

Lo studio è stato condotto secondo la linea guida ICH Guideline for Good Clinical Practice.

Inoltre, lo studio sarà condotto in conformità con il Decreto Ministeriale del 17 dicembre 2004 (studio senza scopo di lucro).

Tutti i pazienti sono stati informati degli obiettivi dello studio, le procedure, i possibili rischi ai quali erano esposti e il meccanismo di assegnazione al trattamento.

Essi erano informati circa la rigorosa riservatezza dei loro dati personali, ma che i loro dati potevano essere rivisti per motivi di studio da parte di individui autorizzati.

La partecipazione è stata totalmente volontaria e il paziente era libero di rifiutare la partecipazione al protocollo oltre che di uscirne in qualunque momento. Questo studio non pregiudica minimamente le successive cure proposte ai pazienti.

RISULTATI

Considerando il numero degli spermatozoi abbiamo riportato un cambiamento rispetto al basale del 23,6% nel gruppo placebo e del 45,3% nel gruppo dei trattati. La differenza tra i due gruppi è statisticamente significativa e ciò è confermato dall'analisi inferenziale ($p = 0,0186$).

Per la concentrazione di spermatozoi, rispetto al basale, abbiamo registrato un miglioramento del 14,1% nel gruppo placebo e 47,8% nel gruppo integratore. Anche in questo caso si è raggiunta la significatività statistica ($p = 0,0117$).

La motilità progressiva degli spermatozoi è stata valutata ed il cambiamento tra la visita basale e la visita di fine studio è stato del 19,6% nel gruppo placebo e del 38,1% nel gruppo integratore. Una differenza significativa tra i due gruppi è evidente e ciò è confermato dall'analisi inferenziale ($p = 0,0088$).

5.4.4 motilità totale di sperma

La motilità totale è cambiata del 15,1% nel gruppo placebo e del 43,3% nel gruppo dei trattati. Anche in questo caso la differenza è significativa e il $p = 0,0071$.

In considerazione della perfetta omogeneità dei due gruppi, oltre all'analisi ANCOVA, è stato indagato il t-test sulla variabile "differenza = finale - base". L'analisi è stata effettuata sia sulla popolazione ITT (Intention To Threat) che sulla popolazione PP (Per Protocol). Per la popolazione ITT la media delle differenze nel gruppo placebo era 1,5%, mentre nel gruppo integratore era 6,3%. Il test è stato statisticamente significativo con $p = 0,0257$. Nella popolazione PP i risultati sono simili. La media delle differenze nel gruppo placebo è stata del 1,6%, mentre nel gruppo integratore era del 7,3%. Il test è stato statisticamente significativo con $p = 0,0160$.

Vedi tabelle di seguito.

Summary of Number of Sperm (mL x 10⁶) by group
ITT Population

		Placebo	Proxead
		N=52	N=52
Baseline	N	52	52
	Missing	0	0
	Mean	41.4	40.8
	Std. deviation	17.9	18.2
	Median	38.3	39.0
	Range	11.0 - 79.0	12.3 - 77.0
Visit 2	N	49	45
	Missing	3	7
	Mean	43.7	51.4
	Std. deviation	13.6	13.9
	Median	44.0	49.0
	Range	16.0 - 79.0	28.0 - 86.0
Changes (%)	N	49	45
	Missing	3	7
	Mean	23.6	45.3
	Std. deviation	73.4	70.9
	Median	0.9	27.3
	Range	-67.1 - 381.8	-37.5 - 296.3

Analysis of Covariance table. Number of Sperm (mL x 10⁶)
ITT Population

ANCOVA table

Overall					

Source	DF	SS	MS	F-value	p-value
Model	3	3464.42	1154.81	6.04	<0.001
Error	100	19108.66	191.09		
Corrected Total	103	22573.08			
95% CI difference of the means					

Statistics	Mean	Lower	Upper		
	6.49	1.11	11.87		
ANCOVA for model terms					

Source	DF	SS	MS	F-value	p-value
Baseline	1	1444.60	1444.60	7.56	0.0070
Presence of varicocele	1	642.89	642.89	3.36	0.0695
Treatment group	1	1093.82	1093.82	5.72	0.0186

Summary of Concentration of Sperm (mL x 10⁶) by group
ITT Population

		Placebo	Proxead
		N=52	N=52
Baseline	N	52	52
	Missing	0	0
	Mean	113.1	114.2
	Std. deviation	37.4	37.8
	Median	107.6	112.1
	Range	30.0 - 197.6	43.2 - 205.8
Visit 2	N	49	45
	Missing	3	7
	Mean	127.8	163.5
	Std. deviation	61.4	64.3
	Median	136.7	158.4
	Range	24.0 - 270.0	48.4 - 369.6
Changes (%)	N	49	45
	Missing	3	7
	Mean	14.1	47.8
	Std. deviation	51.9	59.4
	Median	3.8	35.2
	Range	-77.0 - 153.9	-47.1 - 238.5

Analysis of Covariance table. Sperm Concentration (n x 10⁶)
ITT Population

ANCOVA table

Overall					

Source	DF	SS	MS	F-value	p-value
Model	3	102957.2	34319.05	10.58	<0.001
Error	100	324254.9	3242.55		
Corrected Total	103	427212.1			

95% CI difference of the means

Statistics	Mean	Lower	Upper
	28.65	6.50	50.81

ANCOVA for model terms

Source	DF	SS	MS	F-value	p-value
Baseline	1	48202.99	48202.99	14.87	<0.001
Presence of varicocele	1	5566.32	5566.32	1.72	0.1931
Treatment group	1	21342.00	21342.00	6.58	0.0117

Summary of Progressive Motility of Sperm (%) by group
ITT Population

		Placebo	Proxeed
		N=52	N=52
Baseline	N	52	52
	Missing	0	0
	Mean	23.0	23.4
	Std. deviation	7.8	6.1
	Median	22.3	23.2
	Range	5.9 - 43.2	12.0 - 40.0
Visit 2	N	49	45
	Missing	3	7
	Mean	24.5	23.6
	Std. deviation	7.2	8.2
	Median	23.0	27.0
	Range	8.1 - 44.0	15.0 - 57.9
Changes (%)	N	49	45
	Missing	3	7
	Mean	19.6	38.1
	Std. deviation	53.6	67.2
	Median	4.6	24.4
	Range	-71.2 - 205.1	-48.8 - 252.5

Analysis of Covariance table. Progressive Motility (%)
ITT Population

ANCOVA table

Overall						

Source	DF	SS	MS	F-value	p-value	
Model	3	552.86	184.29	3.34	0.0223	
Error	100	5520.56	55.21			
Corrected Total	103	6073.42				

95% CI difference of the means

Statistics	Mean	Lower	Upper
	3.89	1.00	6.78

ANCOVA for model terms

Source	DF	SS	MS	F-value	p-value	
Baseline	1	28.97	28.97	0.52	0.4704	
Presence of varicocele	1	110.28	110.28	2.00	0.1606	
Treatment group	1	393.58	393.58	7.13	0.0088	

Summary of Total Motility of Sperm (%) by group
ITT Population

		Placebo	Proxeed
		N=52	N=52
Baseline	N	52	52
	Missing	0	0
	Mean	32.6	31.7
	Std. deviation	9.2	8.2
	Median	32.0	31.3
	Range	8.0 - 55.0	18.9 - 48.0
Visit 2	N	49	45
	Missing	3	7
	Mean	34.6	39.0
	Std. deviation	7.1	8.0
	Median	35.0	37.5
	Range	12.0 - 49.2	29.0 - 65.3
Changes (%)	N	49	45
	Missing	3	7
	Mean	15.1	30.9
	Std. deviation	53.8	43.3
	Median	3.8	31.3
	Range	-73.3 - 312.5	-35.6 - 201.6

Analysis of Covariance table. Total Motility (%)
ITT Population

ANCOVA table

Overall					

Source	DF	SS	MS	F-value	p-value
Model	3	599.99	200.00	3.12	0.0295
Error	100	6417.80	64.18		
Corrected Total	103	7017.80			
95% CI difference of the means					

Statistics	Mean	Lower	Upper		
	4.03	0.90	7.15		
ANCOVA for model terms					

Source	DF	SS	MS	F-value	p-value
Baseline	1	149.73	149.73	2.33	0.1298
Presence of varicocele	1	41.29	41.29	0.64	0.4244
Treatment group	1	420.06	420.06	6.55	0.0120

DISCUSSIONE

Gli spermatozoi, come le altre cellule possono essere danneggiati dai ROS. Come ogni noxa patogena, i ROS influenzano alcuni parametri fondamentali del liquido seminale che, generalmente, sono indice fondamentale di fertilità. Infatti, nella valutazione della qualità del liquido seminale e allo scopo di preservare la fertilità, i ROS sono un parametro che deve essere sempre preso in considerazione. Questi parametri seminali sono sia fisico-chimici che morfologici. I fisico-chimici includono il colore, l'aspetto, il volume, il pH, la viscosità oltre che la fluidità. Viceversa i morfologici racchiudono alterazioni della forma e la motilità, quali parametri più importanti. Nel complesso risultano di fondamentale importanza anche la concentrazione e il numero totale degli spermatozoi.

Diversi studi confermano la ben stabilita correlazione tra aumento dei ROS ed invecchiamento e tra l'invecchiamento e il decremento della capacità riproduttiva dell'eiaculato. Sicuramente questa non è l'unica spiegazione per l'infertilità, ma ha un forte impatto sulla capacità riproduttiva maschile. L'insorgenza del deterioramento genetico degli spermatozoi è un fattore che si crede possa iniziare intorno ai trent'anni di età. Anche in età avanzata per gli uomini è possibile procreare, ma la qualità genetica dello sperma, così come il suo volume e la motilità, tipicamente diminuiscono con l'età. Lo sperma degli anziani è meno suscettibile di una gravidanza e, inoltre, la frammentazione del DNA spermatico nel tempo rende più facile la trasmissione alla prole di una malattia genetica.

Un approccio metabolico risulta essere molto utile per la gestione dell'infertilità maschile. Il presente studio sperimentale ha valutato l'impiego di sostanze funzionali atte a migliorare la motilità degli spermatozoi, la concentrazione, la conta e la morfologia, ma anche l'aumento della densità spermatica e l'incidenza delle gravidanze. L'integratore che abbiamo utilizzato è già commercializzato da tempo, brevettato per migliorare la qualità dello sperma e aumentare la probabilità di concepimento. Il prodotto include L-carnitina e acetil-L-carnitina, come componenti principali della sua formulazione. Questo integratore alimentare ha dimostrato la sua efficacia nel migliorare e proteggere il metabolismo energetico, proteggere i tessuti e soprattutto lo sperma dal danno da radicali liberi migliorando la risposta citoplasmatica e biologica a livello del liquido seminale. Tutti questi effetti sono correlati alla presenza delle carnitine che migliorano la beta-ossidazione degli acidi grassi a livello mitocondriale, quale pathway principale nel metabolismo energetico. Le carnitine, inoltre, quali forti antiossidanti sono in grado di proteggere contro i danni provocati dai ROS. Nel nostro studio, alla fine del trattamento, sia nei pazienti affetti da varicocele che nei non affetti, abbiamo osservato un marcato aumento di tutti i parametri della qualità degli spermatozoi come motilità, concentrazione conta totale.

La sicurezza della formulazione è assicurata dalla sua composizione di vitamine, elementi naturali e cofattori enzimatici. La tollerabilità è stata confermata dalla quasi totale assenza di effetti collaterali durante i 6 mesi di trattamento in tutti i 104 pazienti dello studio (vedi tabella di seguito).

Table 5. Listing of the Adverse Events by group
Safety Population

Group	Pt Number	Age	AE description	Onset date	End date	Ongoing?	Severity	Relation	Action Taken	SOC term	PT term
Proxeed	36	32.0	NAUSEA	27/04/2015	20/05/2015	No	Lieve	Probabile	Nessuna	Gastrointestinal disorders	Nausea
			REFLUSO GASTRO-ESOFAGEO	27/04/2015	20/05/2015	No	Moderato	Probabile	Nessuna	Gastrointestinal disorders	Gastroesophageal reflux disease
	67	26.6	NAUSEA	05/06/2015	12/06/2015	No	Moderato	Possibile	Nessuna	Gastrointestinal disorders	Nausea
			VERTIGINI	05/06/2015	12/06/2015	No	Moderato	Possibile	Nessuna	Nervous system disorders	Vertigo
	68	21.1	CEFALEA	13/10/2015	22/10/2015	No	Moderato	Possibile	Nessuna	Nervous system disorders	Headache
			NAUSEA	13/10/2015	22/10/2015	No	Moderato	Possibile	Nessuna	Gastrointestinal disorders	Nausea
	85	27.9	CEFALEA	29/09/2015	05/10/2015	No	Moderato	Possibile	Nessuna	Nervous system disorders	Headache
			NAUSEA	29/09/2015	05/10/2015	No	Moderato	Possibile	Nessuna	Gastrointestinal disorders	Nausea

Su questa base si può stabilire che l'uso di carnitine e altre sostanze funzionali come cofattori enzimatici, elementi naturali e vitamine può essere una buona strategia nella gestione dell'infertilità maschile, riportata anche dall'efficacia del trattamento su pazienti affetti da varicocele. Tutto questo è confermato dal sensibile miglioramento di tutti i parametri seminali riportati dai pazienti arruolati nello studio.

Principali limiti dello studio sono il numero di pazienti che risulta adeguato per la potenza statistica ma non così elevato da valutare risultati su larga scala. Allo stesso modo non sono stati valutati gli effetti dell'intervento chirurgico di varicocelectomia in associazione alla somministrazione del prodotto. Infine una valutazione della frammentazione del DNA avrebbe ulteriormente arricchito l'evidenza scientifica.

BIBLIOGRAFIA

1. Mosher W.D., Pratt W.D. Fecundity and infertility in the United States, 1965-88. Advanced Data from Vital and Health Statistics. Hyattsville: National Center for Health Statistics, 1990.
2. Skakkebaek N.E., Giwercman A., de Kretser D. Pathogenesis and management of male infertility. Review article. Lancet. 1994. 343: 1473-1478.
3. Honig S.C., Lipshulz L.I., Jarow J. Significant medical pathology uncovered by a comprehensive male infertility evaluation. Fertil Steril. 1994, 62, 5: 1028-1034.
4. Laratta L. Nuovi orizzonti in tema di infertilità umana. AIED, Roma, 1993; 3-6.
5. Consiglio Sanitario Nazionale. Relazione sullo stato sanitario del Paese - 1989. Ist. Poligraf. e Zecca dello Stato. Roma, 1991.
6. Sharpe R.M., Skakkebaek N.E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of male reproductive tract? Lancet 1993; 341: 1392-95.
7. Vermeulen A. Environment, human reproduction, menopause and andropause. Envir. Health Perspect 1993; 101 (suppl2): 91-100.
8. Bonde J.P.E. The risk of male subfecundity attributable to welding of metals: studies of semen quality, infertility, fertility, adverse pregnancy outcome and childhood malignancy. Int. J. Androl. 1993; 16: 1-29.
9. Klinefelter H.F.Jr, Refenstien E.C. Jr, Albright F. Syndrome characterized by ginecomastia, aspermatogenesis without a-Leydigism, and increased excretion of follicle-stimulating hormone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1942, 2: 615-627.
10. Lieblich J.M., Rogol A.D., Whith R.H. Syndrome of anosmia with hypogonadotropic hypogonadism (Kallmann syndrome). Clinical and laboratory studies in 23 cases. Am. J. Med. 1982; 73: 506-519.
11. Canale D., Mais V., Turchi P., Andreini F., Melis G.B., Menchini Fabris G.F. Ultrasound monitoring of testis and prostate maturation in hypogonadotropic hypogonadic males during pulsatile Gonadotropin Release hormone treatment. Fertil Steril 1990; 53, 3, 537-540.

12. Wagner T.P.E, Barband G., Vontur Muhren A. Slow pulsing oligospermia. In: Wagner T.O.F. Pulsatile LHRH Therapy of the male. T.M. Verlag Ed. Hameln, 1985.
13. Fabbri A., Aversa A., Ciampani T., Isidori A. Ormoni regolatori ipotalamici e funzione riproduttiva maschile. In: Gli ormoni regolatori dell'ipotalamo. Dalla Biologia alla Clinica. E. Muller Ed., Pythagora Press Milano, 1993: 107-123.
14. Cedron M., Keating M.A., Huff D.S., Koop C.E., McSnyders H., Dukett J.W. Cryptorchidism, orchidopexy and infertility: a critical long term retrospective analysis. J. Urol. 1989; 142: 1546-1560.
15. Hendry W.F. The significance of antisperm antibodies: measurament and management. Clin. Endocrinol. 36: 219-221.
16. Dhabuwala C.B., Hamid S., Moghissi K.S. Clinical versus subclinical varicocele: improvement infertility after varicocelectomy. Fertil. Steril. 1992; 57: 845-857.
17. Rageth J.C., Unger C., Da Rugna D., Steffen R., Stucki D., Barone C., Eijisten A., Rutishauer G., Leibundgut B., Gallo L.M. Long term results of varicocelectomy. Urol. Int. 1992; 42: 327-331.
18. World Health Organization. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. Fertil. Steril. 1992; 57: 1289-1293.
19. Madgar I., Weissenberg R., Lunenfeld B., Karasik A., Glodwasser B. Controlled trial to high spermatic vein ligation for varicocele in infantile men. Pera Steril. 1995; 63: 120-123.
20. Marsman J.W.R, Schats R. The subclinical varicocele debate (Review). Human Reprod. 1994; 9: 1-8.
21. Weiss D.P., Rodriguez-Rigan L.J., Smith K.D. Leydig cell function in oligospermic men with varicocele. J. Urol. 1987; 120: 427-432.
22. Bartelloni M., Canale D., Turchi E, Cilurzo P., Mancini M., Pecori C., Menchini Fabris G.F. Seminal zinc before and after varicocelectomy. In: IInd International Congress on Therapy in Andrology (G.F. Menchini Fabris, D. Canale eds.) Monduzzi, Bologna, 1991: 33-36.
23. Manuale di laboratorio della WHO per l'esame del liquido seminale umano e dell'interazione tra spermatozoi e muco cervicale. III ed. Giornale Italiano di Andrologia 1994; 3.

24. Menchini Fabris G.F., Turchi P La sterilità maschile. In: La Clinica Ostetrica e Ginecologica. G. Candiani, V. Danesino, A. Gastaldi. Masson Ed. 1, 931- 946, 1991.
25. Bar-Chama N., Fish H. Infection and pyospermia in male infertility. Word J. Urol. 1993; 11: 76-81.
26. Wolff N., Polish J.A., Martinez A., Haimovici F., Hill J.A. Andron D.J. Leukospermia associated with poor semen quality. Fertil. Steril. 1990; 53: 528-523.
27. Close C.E. Infection with Chlamydia Trachomatis and male infertility. Fertil. Steril. 1987; 5: 880-883.
28. Widner W., Krause W, Scheifer H.G., Brunner H., Friedrich H.J. Ureaplasma infection of male urogenital tract, in particular prostatitis and semen quality. Urol. I Intern. 1985; 40: 5-9.
29. W.H.O. laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervicalmucus interaction. Cambridge University Press, 2010.
30. Mortimer D. Validation of CASA technology in the andrology laboratory. In "Update on therapy in Andrology", ETS Editrice, Firenze, 1991, 15-25.
31. Zamboni L. The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. In "Modern trends in infertility and conception control, Years book medical publishers, Chicago-London, 1988, vol. 4, 401-424.
32. Foresta C, Scandellari C. Il laboratorio in andrologia. Fondazione MA Foresta editrice, Padova, 1990. Zavos P. Seminal parameters of ejaculates collected from oligospermic patients via masturbation and at intercourse with the use of silastic seminal fluid collection device. Fertil. Steril., 44:517-520, 1985. Fonzo D, Quadri R, Manenti M. Stress e riproduzione maschile: implicazioni immunologiche. In "Stress e riproduzione", CIC Edizioni Internazionali, Roma, 103-110, 1987.
33. Maludis C, Howard EJ, Baker WG. Variations of semen quality in normal men. Intern. of Androl., 55:983-988, 1991.
34. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. Fertil. Steril., 49:112-117, 1988.

35. Schoenfeld CY, Amelar RD, Dubin L, Amelar S. A new staining technique for the rapid determination of the morphologic characteristics of sperm. *Fertil. Steril.*, 36:408-410, 1981.
36. Page EW, Houlding F: The clinical interpretation of 1000 semen analysis among applicants for sterility studies. *Fertil. Steril.*, 2:140-148, 1951.
37. Tulloch WS. Consideration of sterility factor in the light of subsequent pregnancies. *Trans. Edinburgh Obstet. Soc.* 1952; 59: 19-34.
38. MacLeod J. Seminai cytology in the presence of varicocele. *Fertil Steril*, 1965; 16, 6.
39. Ascalat J, Sayfan J. Prevalente of varicocele in young israeli men. *Isr. J. Med. Sci.*, 1984; 20: 1099-1100.
40. Clarke BG. Incidence of varicocele in normal men and among men of different ages. *J.A.M.A.*, 1966; 198: 1121-1122.
41. Zorngiotti A, McLead J. Studies in temperature, human semen quality and varicocele. *Fertil. Steril.* 1973; 24: 964.
42. Zorngiotti A. The spermatozoa count: a short history. *Urology*; 1975; 5: 672.
43. Tulloch WS. Varicocele and subfertility. Results of treatment. *Brit. Med. J.*, 1955; 2: 356-358.
44. Dubin L Amelar RD. Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil. Steril.*, 1970; 21: 606.
45. Pontonnier F, Manseta A, Bernmet E Varicocele et stérilité masculine. *J. d'Urol.*, 1976; 82: 604.
46. Glezerman M, Rakowicz KM, Lunenfeld B et al. Varicocele in oligospermic patients. Pathophysiology and results after ligation and division of the internal spermatic vein. *J. Urol.*, 1976; 115: 562.
47. Lipshultz LI, Corriere IN. Progressive testicular atrophy in the varicocele patient. *J. Urol.*, 1977; 117: 175.
48. Rodriguez-Rigau LI, Smith KD, Steiberger E. Relationship of varicocele to sperm output and fertility. *J. Urol.*, 1978; 120: 691.
49. Cockett ATK et al. The varicocele and semen characteristics. *J. Urol.*, 1979; 121: 435.
50. Roger BJ, Mygatt G et al. Monitoring of suspected infertile men with varicocele by the sperm penetration assay. (Unpublished data).

51. Dubin L, Hotchkiss RS. Testis biopsy in subfertile men with varicocele. *Fertil. Steril.*, 1969; 20: 51.
52. Marks JL, McMahon R, Lipshultz LI. Predictive parameters of successful varicocele repair. *J. Urol.*, 1986; 136: 609.
53. Belgrano E, Trombetta C, Deriu, Salisci E. Varicocele ed infertilità. *Urologia Pratica*, 1993; 3: 77-84.
54. Ivanissevich O, Gregorini H. A new operation for the cure of varicocele. *Sem. Med.*, 1918; 25: 575.
55. Palomo A. Radical cure of varicocele by a new technique; preliminary report. *J. Urol.*, 1949; 61: 604.
56. Goldstein M, Gilbert BR et. al. Microsurgical inguinal varicocelectomy with delivery of the testis: an artery and lymphatic sparing technique. *J. Urol.*, 1992; 148: 1808.
57. Marmar JL, De Benedictis TJ, Prais D. The management of varicoceles by microdissection of the spermatic cord at the external inguinal ring. *Fertil. Steril.*, 1985; 43: 583-588.
58. Ishigami K et al. A new operation for varicocele: use of microvascular anastomosis. *Surgery*, 1970; 67: 620-623.
59. Fox U, Romagnoli G, Colombo F. The microsurgical drainage of the varicocele. *Fertil. Steril.*, 1984; 41: 475.
60. Gaspari A, Ortensi A et al. La terapia microchirurgica del varicocele essenziale associato a sterilità. *Min. Urol.*, 1982; 29: 200.
61. Belgrano E, Puppo P, Gaboardi F, Trombetta C. A new microsurgical technique for varicocele correction. *J. Androl.*, 1984; 5: 148-154.
62. Belgrano E, Puppo P, Quattrini S, Trombetta C, Pittaluga P. Microsurgical spermaticoepigastric anastomosis for treatment of varicocele. *Microsurgery*, 1984; 5: 44-49.
63. Belgrano E, Puppo, Quattrini S, Bottino P, Trombetta C, Pittaluga E. Trattamento percutaneo del varicocele, *Congr. Naz. della S.I.A.*, 1982.
64. Belgrano E, Carmignani G., Puppo P., Quattrini S., Trombetta C.: Transcatheter treatment of varicocele in therapy in *Andrology*, *Excerpta Medica*, International Congress, Serie n. 596 1982, pp. 233-238.

65. Belgrano E, Puppo P, Trombetta C, Giuliani L. The role of venography and sclerotherapy in the management of varicocele, *Eur. Urol.*, 1984, 10, 124-129.
66. Charny CW, Baum S. Varicocele and infertility, *J. A.M.A.* 1968, 204, 1165-1168.
67. Dubin L, Amelar RD. Varicocelectomy: 986 cases in a twelve year study, *Urology*, 1977, 10, 446-449.
68. Lembo A, Foresta C, Rizzoti A, Graziotti P, Zanchetta R, Busolo F. Persistente sterilità in varicoceli sottoposti a legatura della vena spermatica, *Atti S.I.U.*, vol. II, Tomo I, Bologna, 1981, pp. 145-154.
69. Brown JS, Dubin L, Hitchkiss RS. The varicocele as related to fertility, *Fertil. Steril.*, 1967, 18, 46.
70. Olson RD, Stone ER Varicocele: symptomatologic and surgical concepts, *New Eng. J. Med.*, 1949, 240, 877.
71. Ahlberg NE, Barthley O, Chidekel N. Retrograde contrast filling of the left gonadal vein: a roentgenological and anatomical study, *Acta Rad. Diagn.*, 1965, 3, 385.
72. Beinart C, Sniderman, Tamura S, Vaughan ED, Sos TA. Left renal vein to inferior vena cava pressure relationship in humans, *J. Urol.*, 1982, 127, 1070.
73. Bron JS. Venography in subfertile man with varicocele *J. Urol.*; 1967, 98, 388-392.
74. Bruce Jacobs J. Selective gonadal venography *Radiology*, 1968, 92, 885-888.
75. Janson R, Weissbach L. Zur phlebographie der vena testicularis bei varikozelen persistens bzw. rezidiv., *Fortschr. Geb. Rontg. Strahl.*, 1978, 129, 485-490.
76. Pastershank SE Left renal vein obstruction by a superior mesenteric artery, *J. Canad. Ass. Radiol.*, 1974, 25, 52-62.
77. Riebel TH. Phlebographie bei Kindern mit varikozele, *Monatsschr. Kinderkir.*, 1980, 128, 438-440.
78. Zeitler E, Jecht E, Richter EI, Seyferth W. Selective sclerotherapy of the internal spermatic vein in patients with varicoceles, *Ann. Radiol.*, 1980, 23, 371.
79. Coolsaet BLRA. Ureteric pathology in relation to right and left gonadal venis, *Urology*, 1978, 12, 40.
80. Vincent P, Chuang MD. Congenital anomalies of the left renal vein: angiographic considerations. *Br. J. Radiol*, 1974; 42: 214-218.

81. Isidori A, Rocchietti March M, Romanelli F. Valutazione dell'efficacia di una terapia con FSH in pazienti operati per varicocele. In: "Andrologia" a cura di Lotti T e lacono F, ELI, 1993 Napoli.
82. Gattuccio F, Foresta C, Chiodi M, D'Alia O, Pirro-nello S, Amodeo G, Mioni R, Schiavon M. Epidemiologia. In: "Il Varicocele" di Latteri A.M. e Gattuccio E USES, 1989 Firenze
83. Gattuccio F, Pirronello S, Chiodi M. La pubertà maschile a Palermo. Analisi statistica di dati longitudinali e trasversali. Atti V Cong. Naz. Soc. It. Andr., Bologna, 1987.
84. Snell RS. Compendio di Anatomia Clinica. Firenze, USES, 1984
85. Testut L, Latarjet A. Anatomia Umana, vol. IV, UTET, Torino, 1966.
86. Amelar RD, Dubin L. Male infertility: current diagnosis and treatment. Urology, 1973; 1,1.
87. Dubin L, Amelar RD. Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. Fertil Steril. 1970; 21: 606.
88. Coolsaet BLRA. The varicocele syndrome: venography determining the optimal level for surgical management. J. Urol., 1980; 124, 833-839.
89. Comhaire F, Vermaulen A. Varicocele sterility. Cortisol and catecholamines, Fertil Steril., 1974; 25, 88.
90. Donohue RE, Brown JS. Blood gases and pH determinations in the internal spermatic veins of subfertile men with varicocele. Fertil. Steril., 1969; 20: 365.
91. Mc Clure Dale R, Hricak H. Scrotal ultrasound in the infertile men: detection of subclinical unilateral and bilateral varicoceles. J. Urol., 1986; 135: 711-715
92. Orda R, Sayfan J, Manor H, Witz E, Sofer Y. Diagnosis of varicocele and postoperative Evaluation using inguinal ultrasonography. Ann. Surg., 1987; luglio 99-101.
93. Menchini-Fabris GF, Carletti C, Paoli R, Sarteschi M. Testo-Atlante di Ecografia in Andrologia. Rima s.r.l. 1989, Firenze.
94. Rifkin MD, Foy PM, Kurtz AB et al. Role of diagnostic ultrasonography in varicocele evaluation. Radiology 1984; 151: 833.

95. Mali WPTHM, Dei HY, Arndt JW, Kremer J, Coolsaet BLRA, Shuur K. Hemodynamics of varicocele. Correlation among the clinical, flebography, and scintigrafic findings. *J. Urol.*, 1986; 135: 483-488.
96. Who. Comparison among different methods for the diagnosis of varicocele. *Fertil. Steril.*, 1985; 434: 575-582.
97. Adjiman M. Thermographie et varicocele. *Ann. Urol.*, 1977; 11: 117.
98. Comhaire FH. L'esplorazione radiologica nei soggetti portatori di varicocele. *Atti IV Corso di Aggiorn. Fertil. Steril.*, Firenze, 1977; p. 327.
99. Tetti A, Rustichelli S, Alovisei C, Tetti C. Proposta di una classificazione termografica del varicocele del funicolo spermatico. *Min. Gin.*, 1980; 32: 515.
100. Cannizzaro MA, Majorana M, Amodeo C, Romeo G, Immè A, Cosentino F, Morgana R. La teletermografia scrotale nelle dispermie da varicocele. *Min. Urol. Nefr.*, 1985; 37: 57
101. Lo Bosco S, Bellisi M, Pirrello R, Grassi N, Bottino A, Amato C. Termografia. In: "Il Varicocele" di Latteri AM e Gattuccio F, USES, 1989 Firenze.
102. Bervi A. La diagnostica vascolare con Doppler c.w. C.I.C. Edizioni Internazionali, Roma, 1984, p. 99.
103. Ledda A, Belcaro G, Laurora G, Iasonni V, Tenaglia R. Assessment of Varicocele with Angiodinography (Color-Coded Triplex). *Vasc. Surg.* 1991; 25: 559-564.
104. Balercia G, Regoli F, Armeni T, Koverech A, Mantero F, Boscaro M. Placebo-controlled double blind randomized trial on the use of l-carnitine, l-acetylcarnitine or combined l-carnitine and lacetylcarnitine in idiopathic asthenozoospermia. *Fertil Steril.* 2005 Sep;84(3):662-71.
105. Cavallini G, Ferraretti AP, Gianaroli L, Biagiotti G, Vitali G. Cinnoxiam and L-carnitine/acetyl-Lcarnitine treatment for idiopathic and varicocele-associated oligoasthenospermia. *J Androl* 2004;25(5):761-70.
106. De Rosa M, Boggia B, Amalfi B, Zarrilli S, Vita A, Colao A, Lombardi G. Correlation between seminal carnitine and functional spermatozoal characteristics in men with semen dysfunction of various origins. *Drugs R&D* 2005;6(1):1-9.
107. Lenzi A, Sgro P, Salacone P, Paoli D, Gilio B, Lombardo F, Santulli M, Agarwal A, Gandini L. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined

- L-carnitine and Lacetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. *Fertil Steril* 2004;81(6):1578-84.
108. Vicari E, Calogero AE. Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostatovesiculo-epididymitis. *Hum Reprod* 2001;16(11):2338-42.
 109. Vicari E, La Vignera S, Calogero AE. Antioxidant treatment with carnitines is effective in infertile patients with prostatovesiculoepididymitis and elevated seminal leukocyte concentrations after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory compounds. *Fertil Steril* 2002;78(6):1203-8.
 110. Campaniello E, Petrarolo N, Meriggiola MC, Valdiserri A, Pareschi A, Ucci N, Flaminghi C, Filicori M. Carnitine administration in asthenospermia. 4th International Congress of Andrology, Florence 1989.
 111. Costa M, Canale D, Filicori M, D'Iddio S, Lenzi A. L-carnitine in idiopathic asthenozoospermia. A multicenter study. *Andrologia* 1994;26(3):155-9.
 112. Lenzi A, Lombardo F, Sgro P, Salacone P, Caponecchia L, Dondero F, Gandini L. Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril* 2003;79(2):292-300.
 113. Loumbakis P, Anezinis P, Evangeliou A, Delakas D, Sbyrakis N, Cranidis A. Effect of L-carnitine in patients with asthenospermia. *Eur Urol* 1996;30(2 Suppl):954.
 114. Micic SR, Lalic ND, Bojanic N, Nale D. Carnitine therapy of oligospermic men. 25th Annual Meeting of American Society of Andrology. 2000.
 115. Micic SR, Lalic ND, Nale D, Bojanic N. Effects of L-carnitine on sperm motility and number in infertile men. 16th World Congress on Fertility and Sterility 1998.
 116. Muller-Tyl E, Lohninger A, Fischl F, Legenstein E, Staniek H, Kaiser E. [Effects of carnitine on sperm count and motility]. *Fertilitat* 1988;4:1-4.
 117. Vitali G, Parente R, Melotti C. Carnitine supplementation in human idiopathic asthenospermia: clinical results. *Drugs Exp Clin Res* 1995;21(4):157-9.
 118. Moncada ML, Vicari E, Cimino C, Calogero AE, Mongioi A, D'Agata R. Effect of acetylcarnitine treatment in oligoasthenospermic patients. *Acta Eur Fertil* 1992;23(5):221-4.
 119. Vicari E. Effectiveness of a short-term anti-oxidative high-dose therapy on IVF program outcome in infertile male patients with previous excessive sperm radical

- oxygen species production persistent even following antimicrobials administered for epididymitis: preliminary results. In: Ambrosini A, Melis GB, Dalla Pria S, Dessole S, editors. Infertility and assisted reproductive technology. Monduzzi 1997;93-7.
120. Amelar RD, Dubin L, Schoenfeld C. Sperm motility. *Fertil Steril* 1980;34(3):197-215.
 121. Bartellini M, Canale D, Izzo PL, Giorgi PM, Meschini P, Menchini-Fabris GF. L-carnitine and acetylcarnitine in human sperm with normal and reduced motility. *Acta Eur Fertil* 1987;18(1):29-31.
 122. Blanco A. On the functional significance of LDH X. *Johns Hopkins Med J* 1980;146(6):231-5.
 123. Brooks DE. Biochemical environment of sperm maturation. In: Fawcett DW and Bedford JM Editors. Urban and Schwarzenberg 1979;23-34.
 124. Brooks DE. Carnitine, acetylcarnitine and the activity of carnitine acyltransferases in seminal plasma and spermatozoa of men, rams and rats. *J Reprod Fertil* 1979;56(2):667-73.
 125. Brooks DE. Carnitine in the male reproductive tract and its relation to the metabolism of the epididymis and spermatozoa. In: Frenkel RA, McGarry JD, editors. Carnitine biosynthesis, metabolism and functions. Academic Press 1980;219-35.
 126. Bruns KA, Casillas ER. The metabolism of acetylcarnitine and acetate by bovine and hamster epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1989;41(2):218-26.
 127. Carter AL, Stratman FW, Hutson SM, Lardy HA. The role of carnitine and its esters in sperm metabolism. In: Frenkel RA, McGarry JD, editors. Carnitine biosynthesis, metabolism and functions. Academic Press 1980;251-69.
 128. Casillas ER, Villalobos P, Gonzales R. Distribution of carnitine and acylcarnitine in the hamster epididymis and in epididymal spermatozoa during maturation. *J Reprod Fertil* 1984;72(1):197-201.
 129. Engel AG, Rebouche CJ. Carnitine metabolism and inborn errors. *J Inherited Metab Dis* 1984;7(1 Suppl):38-43.
 130. Golan R, Shalev DP, Wasserzug O, Weissenberg R, Lewin LM. Influence of various substrates on the acetylcarnitine:carnitine ratio in motile and immotile human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1986;78(1):287-93.

131. Golan R, Weissenberg R, Lewin LM. Carnitine and acetylcarnitine in motile and immotile human spermatozoa. *Int J Androl* 1984;7(6):484-94.
132. Hinton BT, Snoswell AM, Setchell BP. The concentration of carnitine in the luminal fluid of the testis and epididymis of the rat and some other mammals. *J Reprod Fertil* 1979;56(1):105-11.
133. Jeulin C, Dacheux JL, Soufir JC. Uptake and release of free L-carnitine by boar epididymal spermatozoa in vitro and subsequent acetylation rate. *J Reprod Fertil* 1994;100(1):263-71.
134. Jeulin C, Lewin LM. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Hum Reprod Update* 1996;2(2):87-102.
135. Johansen L, Bohmer T. Motility related to the presence of carnitine/acetyl carnitine in human spermatozoa. *Int J Androl* 1979;2(3):202-10.
136. Kohengkul S, Tanphaichitr V, Muangmun V, Tanphaichitr N. Levels of L-carnitine and L-Oacetylcarnitine in normal and infertile human semen: a lower level of L-O-acetylcarnitine in infertile semen. *Fertil Steril* 1977;28(12):1333-6.
137. Lenzi A, Lombardo F, Gandini L, Dondero F. [Metabolism and action of L-carnitine: its possible role in sperm tail function]. *Arch Ital Urol Nefrol Androl* 1992;64(2):187-96.
138. Lewin LM, Beer R, Lunenfeld B. Epididymis and seminal vesicle as sources of carnitine in human seminal fluid: the clinical significance of the carnitine concentration in human seminal fluid. *Fertil Steril* 1976;27(1):9-13.
139. Marquis NR, Fritz IB. Effect of testosterone on the distribution of carnitine, acetylcarnitine, and carnitine acetyltransferase in tissues of the reproductive system of male rats. *J Biol Chem* 1965;240(5):2197-200.
140. Menchini-Fabris GF, Canale D, Izzo PL, Bartelloni M, Meschini P. Evaluation of human seminal carnitine content in the pathophysiology of reproduction. 3rd International Forum of Andrology 1985.
141. Menchini-Fabris GF, Canale D, Izzo PL, Olivieri L, Bartelloni M. Free L-carnitine in human semen: its variability in different andrologic pathologies. *Fertil Steril* 1984;42(2):263-7.

142. Milkowski AL, Babcock DF, Lardy HA. Activation of bovine epididymal sperm respiration by caffeine. Its transient nature and relationship to the utilization of acetyl carnitine. *Arch Biochem Biophys* 1976;176(1):250-6.
143. Park NC, Agarwal A, Gupta AK, Park HJ, Lee W, Seo YJ. The effect of L-carnitine and acetylcarnitine on oxidative damage to spermatozoa during cryopreservation and thawing. *Annual Meeting of the American Urological Association* 2003.
144. Tanphaichitr N. In vitro stimulation of human sperm motility by acetylcarnitine. *Int J Fertil* 1977;22(2):85-91.
145. Gonzales GF, Villena A. Influence of low corrected seminal fructose levels on sperm chromatin stability in semen from men attending an infertility service. *Fertil Steril* 1997;67(4):763-8.
146. Prendergast FG, Veneziale CM. Control of fructose and citrate synthesis in guinea pig seminal vesicle epithelium. *J Biol Chem* 1975;250(4):1282-9.
147. Rajalakshmi M, Sharma RS, David GF, Kapur MM. Seminal fructose in normal and infertile men. *Contraception* 1989;39(3):299-306.
148. Saeed S, Khan FA, Khan DA, Naveed AK, Ahmad M. Demonstration of the site of obstruction in azoospermia by biochemical markers. *J Pak Med Assoc* 1994;44(6):140-2.
149. Saeed S, Khan FA, Rahman SB, Khan DA, Ahmad M. Biochemical parameters in evaluation of oligospermia. *J Pak Med Assoc* 1994;44(6):137-40.
150. Videla E, Blanco AM, Galli ME, Fernandez-Collazo E. Human seminal biochemistry: fructose, ascorbic acid, citric acid, acid phosphatase and their relationship with sperm count. *Andrologia* 1981;13(3):212-4.
151. Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr* 2001;4(2B):593-9.
152. Kendall NR, McMullen S, Green A, Rodway RG. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. *Anim Reprod Sci* 2000;62(4):277-83.
153. Marin-Guzman J, Mahan DC, Whitmoyer R. Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of

- added sodium selenite in extended semen on sperm motility. *J Anim Sci* 2000;78(6):1544-50.
154. Nikolaev AA, Lutsii DL, Lozhkina LV, Bochanovskii VA, Goncharova LA. [Selenium correction of male subfertility] *Urologiia* 1999;(4):29-32.
 155. Roveri A, Ursini F, Flohe L, Maiorino M. PHGPx and spermatogenesis. *Biofactors* 2001;14(1-4):213-22.
 156. Scott R, MacPherson A, Yates RW, Hussain B, Dixon J. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *Br J Urol* 1998;82(1):76-80.
 157. Vezina D, Mauffette F, Roberts KD, Bleau G. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men. Effects on semen parameters and micronutrient levels and distribution. *Biol Trace Elem Res* 1996;53(1-3):65-83.
 158. Xu D, Ong C, Shen H. [The associations between concentration of selenium in semen and sperm parameters as well as oxidative DNA damage in human sperm] *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2001;35(6):394-6.
 159. Angelitti AG, Colacicco L, Calla C, Arizzi M, Lippa S. Coenzyme Q: potentially useful index of bioenergetic and oxidative status of spermatozoa. *Clin Chem* 1995;41(2):217-9.
 160. Balercia G, Mosca F, Mantero F, Boscaro M, Mancini A, Ricciardo-Lamonica G, Littarru G. Coenzyme Q10 supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: an open, uncontrolled pilot study. *Fertil Steril* 2004;81(1):93-8.
 161. Balercia G, Arnaldi G, Fazioli F, Serresi M, Alleva R, Mancini A, Mosca F, Lamonica GR, Mantero F, Littarru GP. Coenzyme Q10 levels in idiopathic and varicocele-associated asthenozoospermia. *Andrologia* 2002;34(2):107-11.
 162. Lewin A, Lavon H. The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Mol Aspects Med* 1997(18 Suppl):S213-9
 163. Mancini A, De Marinis L, Oradei A, Hallgass ME, Conte G, Pozza D, Littarru GP. Coenzyme Q10 concentrations in normal and pathological human seminal fluid. *J Androl* 1994;15(6):591-4.
 164. Mancini A, Conte G, Milardi D, De Marinis L, Littarru GP. Relationship between sperm cell ubiquinone and seminal parameters in subjects with and without varicocele. *Andrologia* 1998;30(1):1-4.

165. Dabrowski K, Ciereszko A. Ascorbic acid protects against male infertility in a teleost fish. *Experientia* 1996;52(2):97-100.
166. Dawson EB, Harris WA, Rankin WE, Charpentier LA, McGanity WJ. Effect of ascorbic acid on male fertility. *Ann N Y Acad Sci* 1987;498:312-23.
167. Dawson EB, Harris WA, Teter MC, Powell LC. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil Steril* 1992;58(5):1034-9.
168. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(24):11003-6.
169. Al-Bader A, Omu AE, Dashti H. Chronic cadmium toxicity to sperm of heavy cigarette smokers: immunomodulation by zinc. *Arch Androl* 1999;43(2):135-40.
170. Caldamone AA, Freytag MK, Cockett AT. Seminal zinc and male infertility. *Urology* 1979;13(3):280-1.
171. Chia SE, Ong CN, Chua LH, Ho LM, Tay SK. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *In J Androl* 2000;21(1):53-7.
172. Fuse H, Kazama T, Ohta S, Fujiuchi Y. Relationship between zinc concentrations in seminal plasma and various sperm parameters. *Int Urol Nephrol* 1999;31(3):401-8.
173. Giralt M, Molinero A, Carrasco J, Hidalgo J. Effect of dietary zinc deficiency on brain metallothionein-I and -III mRNA levels during stress and inflammation. *Neurochem Int* 2000;36(6):555-62.
174. Huang YL, Tseng WC, Cheng SY, Lin TH. Trace elements and lipid peroxidation in human seminal plasma. *Biol Trace Elem Res* 2000;76(3):207-15.
175. Mohan H, Verma J, Singh I, Mohan P, Marwah S, Singh P. Inter-relationship of zinc levels in serum and semen in oligospermic infertile patients and fertile males. *Indian J Pathol Microbiol* 1997;40(4):451-5
176. Omu AE, Al-Qattan F, Al-Abdul-Hadi FM, Fatinikun MT, Fernandes S. Seminal immune response in infertile men with leukocytospermia: effect on antioxidant activity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;86(2):195-202.

177. Omu AE, Dashti H, Al-Othman S. Treatment of asthenozoospermia with zinc sulphate: andrological, immunological and obstetric outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;79(2):179-84.
178. Saxena DK, Murthy RC, Singh C, Chandra SV. Zinc protects testicular injury induced by concurrent exposure to cadmium and lead in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1989;64(2):317-29.
179. Sorensen MB, Stoltenberg M, Danscher G, Ernst E. Chelation of intracellular zinc ions affects human sperm cell motility. *Mol Hum Reprod* 1999;5(4):338-41.
180. Takihara H, Cosentino MJ, Cockett AT. Effect of low-dose androgen and zinc sulfate on sperm motility and seminal zinc levels in infertile men. *Urology* 1983;22(2):160-4.
181. Wong WY, Thomas CM, Merkus JM, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertil Steril* 2000;73(3):435-42.
182. Zhang X, Jin L, Takenaka I. Galvanotactic response of mouse epididymal sperm: in vitro effects of zinc and diethyldithiocarbamate. *Arch Androl* 2000;45(2):105-10.
183. Wallock LM, Tamura T, Mayr CA, Johnston KE, Ames BN, Jacob RA. Low seminal plasma folate concentrations are associated with low sperm density and count in male smokers and nonsmokers. *Fertil Steril* 2001 Feb;75(2):252-9.
184. Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 2002;77(3):491-8.
185. Isoyama R, Baba Y, Harada H, Kawai S, Shimizu Y, Fujii M, Fujisawa S, Takihara H, Koshido Y, Sakatoku J. Clinical experience of methylcobalamin (CH₃-B₁₂)/clomiphene citrate combined treatment in male infertility] *Hinyokika Kyo* 1986;32(8):1177-83.
186. Isoyama R, Kawai S, Shimizu Y, Harada H, Takihara H, Baba Y, Sakatoku J. [Clinical experience with methylcobalamin (CH₃-B₁₂) for male infertility] *Hinyokika Kyo* 1984;30(4):581-6.
187. Kawata T, Tamiki A, Tashiro A, Suga K, Kamioka S, Yamada K, Wada M, Tanaka N, Tadokoro T, Maekawa A. Effect of vitamin B₁₂-deficiency on testicular tissue in rats fed by pairfeeding. *Int J Vitam Nutr Res* 1997;67(1):17-21.

188. Kumamoto Y, Maruta H, Ishigami J, Kamidono S, Orikasa S, Kimura M, Yamanaka H, Kurihara H, Koiso K, Okada K, et al. [Clinical efficacy of mecobalamin in the treatment of oligozoospermia--results of double-blind comparative clinical study]. *Hinyokika Kyo* 1988;34(6):1109-32.
189. Sandler B, Faragher B. Treatment of oligospermia with vitamin B12. *Infertility* 1984;133-8.
190. Machin, D., Campbell, M., Fayers, P., and Pinol, A. 1997. *Sample Size Tables for Clinical Studies*, 2nd edition. Blackwell Science. Malden, MA.
191. Cohen J. (1988) *Statistical Power Analysis for the Behavioural Sciences*, Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, New Jersey.
192. Steel R.G.D., Torrie J.H., Dickey D.A. (1997) *Principles and Procedures of Statistics – A Biometrical Approach*. Third Edition, McGraw-Hill International Book Company, London.
193. Armitage P., Berry G. Matthews J.N.S. (2002) *Statistical methods in Medical Research*. 4th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, England..
194. Siegel S., Castellan N.J. Jr.(1992) *Statistica non Parametrica* 2a Edizione, McGraw-Hill Libri Italia – Milano.
195. BMDP Statistical Software, University of California Press, Release 2009 – Berkeley, Los Angeles, Oxford.
196. Hintze, J. (2011). *PASS (Power Analysis and Sample Size System)* 11. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA.
197. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004; 6:616-27.
198. Arduini A. Carnitine and its acyl esters as secondary antioxidants? *Am Heart J* 1992; 6:1726-7.
199. Balercia G, Regoli F, Armeni T, et al. Placebo-controlled doubleblind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. *Fertil Steril* 2005; 3:662-71.
200. Bremer J. Carnitine: metabolism and functions. *Physiol Rev* 1983; 4:1420-80.

201. Cavallini G, Ferraretti AP, Gianaroli L, et al. Cinnoxycam and L-carnitine/acetyl-L-carnitine treatment for idiopathic and varicocele-associated oligoasthenospermia. *J Androl* 2004; 5:761-70; discussion 771-2.
202. Costa M, Canale D, Filicori M, et al. L-carnitine in idiopathic asthenozoospermia: a multicenter study. Italian Study Group on Carnitine and Male Infertility. *Andrologia* 1994; 3:155-9.
203. Lenzi A, Sgrò P, Salacone P, et al. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined L-carnitine and L-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. *Fertil Steril* 2004; 6:1578-84.
204. Lenzi A, Lombardo F, Sgrò P, et al. Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril* 2003; 2:292-300.
205. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004; 1:129-38.
206. Pacey AA. Environmental and lifestyle factors associated with sperm DNA damage. *Hum Fertil (Camb)*. 2010; 4:189-93.
207. Schwartz D, Mayaux MJ, Spira A, Moscato ML, Jouannet P, Czyglik F, David G. Semen characteristics as a function of age in 833 fertile men. *Fertil Steril* 1983; 4:530-5.
208. Sigman M, Glass S, Campagnone J, Pryor JL. Carnitine for the treatment of idiopathic asthenospermia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 2006; 5:1409-14. 13.
209. Syntin P, Robaire B. Sperm structural and motility changes during aging in the Brown Norway rat. *J Androl*. 2001; 2:235-44. 14.
210. Smith R, Kaune H, Parodi D, et al. Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for infertility. Relationship with oxidative stress. *Rev Med Chil* 2007; 3:279-86.
211. Vicari E, Calogero AE. Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostatitis-epididymitis. *Hum Reprod* 2001; 11:2338-42.
212. Zhou X, Liu F, Zhai S. Effect of L-carnitine and/or L-acetyl-carnitine in nutrition treatment for male infertility: a systematic review. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16:383-90.